

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza genetických změn pomocí
metody arrayCGH u pacientů
s mnohočetným myelomem**

Diplomová práce

Šárka Šmídová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Mgr. Jana Balcárková, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem následující diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Jany Balcárkové, Ph.D.

V Olomouci dne.....

Šárka Šmídová

Souhrn

Diplomová práce se zabývá analýzou cytogenetických změn pomocí metody komparativní genomové hybridizace na čipu (aCGH) u pacientů s mnohočetným myelomem.

V teoretické části jsou zmíněny všeobecné informace o tvorbě krevních buněk a vývoji B lymfocytů. Jsou zde popsány nejčastěji se vyskytující monoklonální gamapatie se zaměřením na mnohočetný myelom. U mnohočetného myelomu jsou shrnuty příznaky, možnosti vyšetření, kritéria pro diagnózu, dále pak nejčastěji se vyskytující cytogenetické změny a metody jejich detekce.

V praktické části je analyzován soubor 51 pacientů s diagnózou mnohočetný myelom, u kterého byly metodou aCGH vyšetřovány chromozomové abnormality. Změny byly detekovány u 50 pacientů. Nejčastěji detekovanými změnami bylo zmnožení celých chromozomů (30 pacientů), zmnožení dlouhých ramen chromozomu 1 (29 pacientů) a ztráty celých chromozomů (27 pacientů). Celkem 30 pacientů náleželo do skupiny s hyperdiploidním myelomem a 20 pacientů do skupiny s nonhyperdiploidním myelomem. Pro doplnění *IGH* translokací byly použity výsledky z analýzy metodou FICTION (fluorescence immunophenotyping and fluorescence *in situ* hybridization).

Diplomová práce potvrdila význam metody aCGH pro analýzu cytogenetických aberací, její důležitost v kombinaci s metodou FISH a prokázala výskyt vysoce heterogenních změn u pacientů s mnohočetným myelomem, které mohou sloužit k rozdělení pacientů do prognostických skupin a ovlivnit volbu léčby.

Summary

This thesis deals with the analysis of cytogenetic changes using aCGH method in patients with multiple myeloma.

Theoretical part summarizes basic information about blood cells formation and B cell development. Furthermore there are described the most common monoclonal gammopathies, especially multiple myeloma. In multiple myeloma symptoms, examinations options, criteria for diagnosis, the most frequently occurring cytogenetics changes and methods for their detection are summarized.

The experimental part contains group of 51 patients. All of them where examined by aCGH method. Chromosomal aberrations were detected in 50 patients. The most frequently detected changes were gain of whole chromosomes (30 cases), multiplication of 1q (29 cases) and loss of whole chromosomes (27 cases). Total of 30 patients belonged to hyperdiploid myeloma and 20 patients belonged to nonhyperdiploid group. IGH translocations were analyzed using FICTION (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetic as a tool for the investigation of neoplasm) method.

The thesis confirmed the importance of aCGH method for analysis of cytogenetic aberrations in multiple myeloma, especially in combination with FISH method showed the occurrence of highly heterogeneous changes in multiple myeloma patients, which can divide patients into prognostic groups and may also influence the treatment approach.

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí Mgr. Janě Balcárkové, PhD. za skvělé vedení, cenné rady a v neposlední řadě za zkušenosti, které mi v průběhu mé práce předala. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky, který mi ve složitých situacích neváhal pomoci.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektů IGA_LF_2018_004, IGA_LF_2019_001 a RVO (FNOL, 000-98 892).

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle práce:.....	2
3. Teoretická část.....	3
3.1. Úvod do hematologie.....	3
3.1.1. B lymfocyty a jejich vývoj	4
3.2. Monoklonální gapamatie (MG)	5
3.3. Mnohočetný myelom	7
3.3.1. Příznaky.....	7
3.3.2. Vyšetření	8
3.3.3. Kritéria pro určení diagnózy a stádia MM	8
3.3.4. Léčba	11
3.4. Cytogenetické změny u MM.....	11
3.4.1. Početní změny chromozomů	12
3.4.2. Primární IGH Translokace	13
3.4.3. Delece genu TP53	14
3.4.4. Abnormality chromosomu 1	15
3.4.5. Sekundární translokace	15
3.4.6. Chromotripse.....	16
3.4.7. Ztráta heterozygoty (LOH).....	17
3.4.8. Specifické genové mutace (geny RAS, MYC, TP53, BRAF)	17
3.5. Metody detekce změn u MM	18
3.5.1. G-pruhování	18
3.5.2. Molekulárně cytogenetická analýza	19
3.5.3. MACS.....	20
4. Praktická část.....	22
4.1. Materiál a metody	23

4.1.1. Magnetická separace CD138+ buněk pomocí Whole Blood Column Kitu	23
4.1.2. Příprava skel s buňkami CD138+ pro analýzu metodou FISH	24
4.1.3. Izolace DNA z CD138+ frakce pomocí kitu.....	25
4.1.4. Izolace DNA z fixovaných buněk fenol-chloroformovou metodou.....	27
4.1.5. Kontrola kvality DNA.....	28
4.1.6. Komparativní genomová hybridizace na čipu.....	29
4.2. Analýza obrazu a hodnocení	33
5. Výsledky.....	36
5.1. Změny v celkovém souboru pacientů	37
5.2. Hyperdiploidní typ MM.....	41
5.3. Nonhyperdiploidní typ MM.....	42
5.4. Změny <i>IGH</i> genu	42
5.5. Opakovaná vyšetření.....	43
5.6. Vyšetření buněk z periferní krve	45
5.7. Analýza metodou FICTION	45
6. Diskuze	47
7. Závěr.....	52
8. Seznam zdrojů	53
9. Přílohy	63

Seznam zkratek

arrayCGH (aCGH)	array-based comparative genomic hybridization (komparativní genomová hybridizace na čipu)
CNL-LOH	copy number losses loss of heterozygosity (ztráta heterozygosity spojená se ztrátou kopie alely)
CNN-LOH	copy number neutral loss of heterozygosity (ztráta heterozygosity bez ztráty kopie alely)
CTH	chromotripse
FACS	fluorescence-activated cell sorting (fluorescenčně aktivovaná separace buněk)
<i>FGFR3</i>	fibroblast growth factor receptor 3 gene (gen pro receptor fibroblastového růstového faktoru 3)
FICTION	fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetic as a tool for the investigation of neoplasm
FISH	fluorescence in situ hybridization (fluorescenční in situ hybridizace)
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
H-MM	hyperdiploid multiple myeloma (hyperdiploidní mnohočetný myelom)
HSC	hematopoietic stem cell (hemopoetická kmenová buňka)
Icg – FISH	cytoplasmic immunoglobulin-fluorescence in situ hybridization (imunofenotypové značení a následná interfázní fluorescenční in situ hybridizace)
IMWG	The International Myeloma Working Group (Mezinárodní myelomová pracovní skupin)
ISCN	International system for human cytogenomic nomenclature
ISS	The international staging system
KD	kostní dřeň
KRAS, NRAS, HRAS	proteiny, produkty genů z rodiny RAS (Rat Sarcoma)

LOH	loss of heterozygosity (ztráta heterozygosity)
MACS	magnetic activated cell sorting (magneticky aktivovaná separace buněk)
MAPK	Mitogen activated protein kinase (mitogeny aktivovaná protein kináza)
M-FISH	multicolor FISH (mnohobarevná FISH)
MG	Monoklonální gamapatie
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance (monoklonální gamapatie nejasného významu)
MM	multiple myeloma (mnohočetný myelom)
<i>MYC</i>	myelocytomatosis oncogene (protoonkogenů kódující jaderné transkripční faktory)
NH-MM	nonhyperdiploid multiple myeloma (nonhyperdiploidní mnohočetný myelom)
PB	plazmatická buňka
<i>RB1</i>	RB1 retinoblastoma 1 gene
SMM	smouldering myeloma (doutnající mnohočetný myelom)
<i>TP53</i>	TP53 tumor protein p53 gene (nádorový supresorový gen)
WM	Waldenströмова magroglobulinemie

1. Úvod

Monoklonální gamapatie jsou heterogenní skupinou hematologických onemocnění charakterizovanou přítomností monoklonálního imunoglobulinu detekovatelného v séru či v moči. Nejčastěji se vyskytující monoklonální gamapatií je benigní monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), u které je trvale zvýšené riziko přechodu do maligního stádia – mnohočetného myelomu (MM). (Mikulášová *et al.*, 2012), (Maisnar, 2013). Mnohočetný myelom představuje 1 % všech nádorů a je druhou nejčastější hematologickou malignitou. Medián věku při diagnóze se pohybuje od 66 do 70 let (Kazandjian, 2016).

Cytogenetické měny se vyskytují u 80-85 % pacientů s MM a hrají klíčovou roli v určování prognózy onemocnění. Dle detekovaných změn se dají pacienti rozdělit do skupiny s hyperdiploidním a nonhyperdiploidním typem MM. (Kjeldsen, 2016; Grzasko *et al.*, 2017).

V současné době se k detekci změn používají hlavně techniky molekulární cytogenetiky jako FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace) a aCGH (komparativní genomová hybridizace na čipu). Kombinací obou metod lze dosáhnout velkého záchytu jak *IGH* translokací, tak početních změn chromozomů (Rack *et al.*, 2016).

2. Cíle práce:

1. Zpracování literární rešerše na téma mnohočetný myelom a metoda arrayCGH
2. Zvládnutí technik izolace DNA z různých materiálů (kostní dřev, fixované buňky pro cytogenetickou analýzu, separované CD 138+ buňky)
3. Vyšetření souboru pacientů s MM metodou arrayCGH
4. Ověření výsledků metody arrayCGH metodou FICTION a porovnání výsledků obou metod

3. Teoretická část

3.1. Úvod do hematologie

Krvetvorba (hematopoéza) je proces tvorby krevních elementů v krvetvorných orgánech a skládá se z fáze prenatalní a postnatalní. Prenatální fáze se dělí na zárodečnou a fetální. Prenatální krvetvorba začíná v raném stádiu těhotenství a zahrnuje období mezoblastové, hepatolienální a medulární. Jednotlivé fáze se navzájem prolínají. Mezoblastové období začíná mezi 14 a 19. dnem těhotenství, kdy začíná krvetvorba v krevních ostrůvcích žloutkového vaku a je prakticky pouze erytroidní povahy. Období mezoblastové trvá od 3. do 10. týdne nitroděložního vývoje. Hepatolienální (jaterní) období nastává po 6. týdnu zárodečného života. Krvetvorba se přesouvá hlavně do jater. Od 12. týdne těhotenství se v menší míře začíná podílet i slezina. V tomto období vznikají i mateřské buňky bílých krvinek a krevních destiček. Období hepatolienární krvetvorby trvá až do porodu. Od 20. týdne začíná medulární období, kdy se všechny druhy krvinek začínají tvořit i v kostní dřeni (KD). Nejprve se krvetvorba objevuje v klíčních kostech, později i ve všech ostatních (Pecka, 2002). Mimodřeňová krvetvorba přestává fungovat ve 2-3. týdnu po narození a za normálních okolností přetrvává krvetvorba pouze v KD. U patologických stavů se může obnovit i v jiných orgánech (slezina, játra...). Po narození produkuje krevní buňky KD v celém těle. Takovou KD nazýváme červená. S postupem života této dřeni ubývá a mění se na KD tukovou (inaktivní). Nejdéle bývá krvetvorba zachována v obratlích, žebrech, hrudní kosti, pánvi a koncích stehenních kostí (Pecka, 2002).

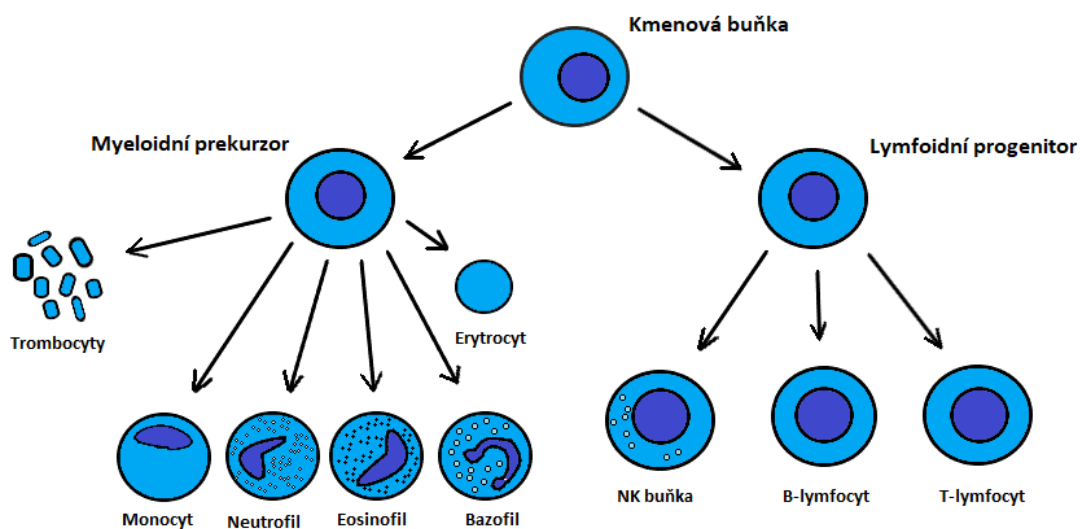
Krevní buňky vznikají z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk. Jako kmenové buňky se označují nediferencované krevní buňky, které mají schopnost sebeobnovy a dále se diferencují do buněčných linií jednotlivých krevních řad.

Pluripotentní mateřská buňka je označována jako HSC (hematopoetic stem cell), má vysokou schopnost sebeobnovy a dále se diferencuje na buňku progenitorovu, která je předurčená pro diferenciaci do jedné či více krevních řad. Progenitorové buňky mají malou schopnost sebeobnovy a vysokou schopnost diferenciaci, která má za následek vznik buněk prekurzorových. Jejich další diferenciaci a zrání v konkrétní krevní buňky má charakteristické společné rysy, jako je kondenzace chromatinové struktury jádra a snižování aktivity jadérka (Anděl *et al.*, 2001).

V průběhu hematopoézy dává progenitorová kmenová buňka vznik buňkám myeloidní a lymfoidní řady. Z myeloidního prekurzoru vznikají monocyty, granulocyty,

trombocyty a erytrocyty. Granulocyty se dále dělí dle přítomnosti granulí na neutrofilní, eozinofilní a bazofilní. Z lymfoidního progenitoru se vyvíjejí T a B lymfocyty a NK buňky. Hematopoéza je zjednodušeně znázorněna na Obrázku 1. Lymfocyty v lymfatické řadě nazýváme buňkami imunokompetentními, jelikož mají schopnost podílet se na vývoji imunitní reakce (Krahulcová *et al.*, 1996; Hořejší *et Bartůňková*, 2009). Lymfocyty vznikají hlavně v lymfatických orgánech, které se dělí na primární (brzlík a KD) a sekundární (slezina, lymfatické uzliny, tonsily). V periferní krvi kolují B i T lymfocyty v klidovém stavu, po aktivaci se mění na lymfoblasty (Pecka, 2002).

Obrázek 1: Hematopoéza (upraveno dle Hořejší *et Bartůňková*, 2009)



3.1.1. B lymfocyty a jejich vývoj

B lymfocyty představují asi 25 % lymfocytů cirkulujících v periferní krvi, s krátkou životností asi 10 až 20 dní. Jejich typickou charakteristikou je přítomnost imunoglobulinů na povrchu (Anděl *et al.*, 2001). Geny, které kódují řetězce imunoglobulinů se skládají z několika různých úseků – genových segmentů. Při vývoji lymfocytu dochází k jejich přeskupování. Geny pro těžké (H) řetězce se nacházejí v genovém komplexu na chromozomu 14. Komplex obsahuje sekvenčně podobné úseky V, úseky D, J a C. Geny pro lehké (L) řetězce kappa a lambda se také nacházejí v genových komplexech, které neobsahují segmenty D. Geny pro kappa L řetězce leží na chromozomu 2, zatímco geny pro lambda L řetězce jsou lokalizovány na chromozomu 22.

Při vývoji B lymfocytu dochází v progenitorech B lymfocytů k vyštěpování genových komplexů mezi náhodným D segmentem a některým J segmentem (D-J

přeskupení). Poté následuje vyštěpení úseku mezi náhodným V segmentem a DJ segmentem (V-D přeskupení). Po VDJ rekombinaci vzniká pre-B lymfocyt a začíná přeskupování subgenů pro L řetězce – alelická exkluze. Nejprve probíhá přeskupování subgenů řetězce kappa, není-li úspěšné, začíná přeskupování genů lambda. Není-li ani toto přeskupování úspěšné, pre-B lymfocyt hyne. Pokud proběhlo přeskupování úspěšně, vzniká B lymfocyt produkující kompletní povrchový imunoglobulin IgM.

Většina B lymfocytů se po setkání s antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech (slezina, lymfatické uzliny) pomnoží, diferencuje na plazmatické buňky, které jsou konečným vývojovým stádiem a sekretují protilátky. Protilátky produkované plazmatickými buňkami jsou převážně charakteru IgM a mají nízkou afinitu k antigenu. Část buněk se po setkání s antigenem přemění na paměťové buňky, které jsou zodpovědné za imunologickou paměť, tedy po opakovaném setkání s antigenem spouštějí sekundární odpověď. Sekundární odpověď je iniciována pomocí Th lymfocytu a folikulárních dendritických buněk, které stimulují B lymfocyt k další diferenciaci a dělení. Dochází k intenzivním mutacím ve V segmentech (somatická hypermutace) a pro H a L řetězce imunoglobulinů. Další fází je izotopový přesmyk, po kterém se začnou tvořit místo původních IgM i jiné izotypy protilátek jako IgG, IgA, IgE. Dochází při něm k vyštěpování úseků pro H řetězce. Výsledkem všech těchto dějů je vznik protilátek, které mají vyšší afinitu k antigenu (Hořejší *et* Bartůňková, 2002; Hořejší *et* Bartůňková, 2009).

3.2. Monoklonální gamopatie (MG)

Jedná se heterogenní skupinu onemocnění charakterizovanou maligní nebo potenciálně maligní klonální proliferací diferencovaných B lymfocytů produkujících monoklonální imunoglobulin (M-protein, paraprotein) nebo jeho části (lehké řetězce), který lze detekovat v séru nebo v moči (Maisnar, 2013; Ščudla *et al.*, 2017).

V současné době se MG rozděluje dle prognózy a možností léčby na zhoubné a nezhooubné. Mezi maligní onemocnění patří skupina plazmocelulárních proliferací, které tvoří hlavně jednotlivé typy mnohočetného myelomu. Druhou skupinou maligních onemocnění jsou lymfoproliferativní stavy, mezi které patří například Waldenströмова makroglobulinemie. Do skupiny nezhooubných onemocnění náleží MGUS a MG s depozicí fragmentů jako je AL amyloidóza (Ščudla *et al.*, 2017). MG se v mladších věkových

skupinách příliš nevyskytují a jejich výskyt roste s věkem. Po 85 roce života se jejich incidence pohybuje mezi 10-15 % (Maisnar, 2013).

Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je nejčastější formou MG tvořící cca 50 % všech gamapatií. Jedná se o asymptomatické onemocnění s proliferací plazmocytů spojené s produkcí M proteinu, u kterého zároveň nejsou splněna diagnostická kritéria MM, Waldenströmovy makroglobulinemie ani jiného zhoubného lymfoproliferativního onemocnění. MGUS je charakterizována přítomností méně než 30 g/l M proteinu v séru/moči, méně než 10 % plazmatických buněk v KD a nepřítomností orgánového poškození (Klincová *et al.*, 2011). Stejně jako u ostatních MG – incidence MGUS roste s věkem. U pacientů pod 50 let se téměř nevyskytuje (0,2 %), zatímco u pacientů nad 70 let její výskyt vzrůstá na 3 %. Incidence MGUS je odlišná u různých etnických skupin, nejčastěji se vyskytuje u Afroameričanů, naopak nejméně u Japonců. Je prokázáno, že MGUS vždy předchází malignímu onemocnění MM, kdy riziko progresu stoupá s každým rokem o 1 % (Klincová *et al.*, 2011; Maisnar, 2013).

Doutnající myelom (SMM) je přechodné stadium mezi MGUS a MM. Jedná se o bezpříznakové onemocnění se stejnými kritérii pro diagnózu jako MGUS, ale vyšším zastoupením PB v KD ($\geq 10\%$). Podstatným rozdílem je až 10% pravděpodobnost progresu do maligního stavu. Pravděpodobnost progresu s postupem let klesá, po 10 letech činí 1 %. Pacienty s SMM lze rozdělit do několika rizikových skupin. Jako dobrý ukazatel rizika se ukázala stabilita a množství M-proteinu v čase. Medián věku pacientů se neliší od ostatních MG, pohybuje se mezi 65-70 lety.

Pacienti s MGUS i SMM nepodstupují žádnou léčbu, je však nutné jejich pravidelné sledování. Léčba je zahájena až při přechodu do MM (Machálková *et* Maisnar, 2014).

Waldenströмова magroglobulinemie (WM) je maligní onemocnění, jehož podstatou je maligní mutace B-lymfocytu, proliferace a diferenciace na lymfoplazmocytární buňky. Diferenciace nepokračuje až na plazmatické buňky jako je tomu u MM. Maligní buňky produkují nejčastěji imunoglobulin IgM. Medián záhytu onemocnění je 63 let. Výskyt se stejně jako u další MG zvyšuje s věkem. Je dvakrát častější u mužů než u žen a je celkově mnohem vzácnější než MM (Adam *et al.*, 1999).

AL amyloidóza patří mezi skupinu amyloidóz. Amyloidózy jsou vzácnou skupinou onemocnění, při níž dochází k ukládání nerozpustných amyloidních proteinů do tělních

orgánů, což nakonec vede k narušení jejich funkce a ke smrti. AL amyloidóza je nejčastěji se vyskytující amyloidózou, při které klonální plazmatické buňky produkují amyloidní lehké řetězce imunoglobulinu, které se ukládají do různých orgánů (zejména srdce a ledviny) a způsobují jejich poškození. Toto onemocnění často doprovází onemocnění jako je MM, WM, či Hodgkinův lymfom. Vyskytuje se více u mužů než u žen (Baker *et* Rice, 2012).

3.3. Mnohočetný myelom

Jedná se o zhoubné onemocnění způsobené maligní transformací B lymfocytů a jejich následnou klonální proliferací a akumulací pozměněných plazmocytů (myelomových buněk). Tyto buňky jsou charakteristické svojí dlouhověkostí a produkcí monoklonálních protilátek (Adam *et al.*, 1999; Adam *et al.*, 2001). Monoklonální protilátky mají nejčastěji podobu kompletní molekuly imunoglobulinu, méně často je monoklonální imunoglobulin tvořen jen lehkými řetězci, ve výjimečných případech se objevují pouze spojovací J řetězce imunoglobulinů (Adam *et al.*, 2001).

Mnohočetný myelom představuje 1 % všech nádorů a je druhou nejčastější hematologickou malignitou. Medián věku při diagnóze se pohybuje od 66 do 70 let s tím, že 37 % pacientů je mladších 65 let. U pacientů mladších 30 let se téměř nevyskytuje a postihuje více mužskou část populace. MM není považován za genetické onemocnění (Kazandjian, 2016). V současné době nově diagnostikovaní pacienti přežívají více než 10 let (Landgren *et* Rajkumar, 2016). Předpokládá se, že symptomatickému MM předchází ve většině případů asymptomatické, premaligní stádium MGUS (Rajkumar, 2016).

3.3.1. Příznaky

Nejčastějším příznakem jsou bolesti kostí, které jsou způsobené cytokiny produkovanými myelomovými buňkami. Bolesti vznikají v důsledku difúzní či ložiskové osteolýzy, která může vést k patologické kompresivní fraktuře. Velmi častým anamnestickým projevem jsou bolesti bederní páteře způsobené frakturami obratlů. Dalšími příznaky způsobenými cytokiny jsou metabolické poruchy (hyperkalcemie a hyperurikemie) a infekce způsobené imunosupresí. Porucha imunity nastává v důsledku poruchy B buněčné a později i T buněčné imunity. Cytokiny dále způsobují anémii.

Další příznaky jsou způsobené monoklonálním imunoglobulinem. Mezi ně patří motorická a senzitivní polyneuropatie projevující se difúzní bolestí končetin a myelomová nefropatie způsobená převážně monoklonálními lehkými řetězci. Poruchy hemostázy jako

je trombocytopenie, se vyskytují hlavně u pacientů s produkcí lehkých řetězců. Dochází zde k navázání lehkých řetězců na trombocyty a narušení jejich funkce. Hyperviskozita, projevující se purpurou, krevními výrony a krvácením do trávicího ústrojí, je příznakem zejména IgM gamapatií.

K méně častým příznakům patří syndrom zvýšené kapilární propustnosti, kardiální příznaky a plazmocelulární pleurální výpotek (Adam *et al.*, 2001).

3.3.2. Vyšetření

Při podezření na MM se provádí několik základních vyšetření, která potvrdí přítomnost onemocnění. První volbou je provedení laboratorního vyšetření krevního obrazu a moči (po 24. hodinovém sběru). Pro zachycení monoklonálního imunoglobulinu, který je přítomný u 99 % pacientů, jsou určeny tři základní testy: elektroforéza proteinů, imunofixační elektroforéza a stanovení volných lehkých řetězců v séru (Šálek, 2008).

Dalším krokem jsou zobrazovací metody. Mezi ně patří RTG celého skeletu pro zjištění přítomnosti osteolytických ložisek. Jako doplněk RTG vyšetření se používá CT vyšetření s přesnější rozlišovací schopností pro zaměření konkrétních částí těla. Nejpřesnější a nejcitlivější metodou pro zjištění rozsahu infiltrace kostí myelomem je magnetická rezonance (MRI), která umožňuje detekovat ložiska i mimo skelet.

Pro stanovení diagnózy je nezbytné vyšetření kostní dřeně, která se získá pomocí punkce či trepanobiopsie (Adam *et al.*, 2009).

3.3.3. Kritéria pro určení diagnózy a stádia MM

V roce 2014 vydala myelomová mezinárodní pracovní skupina (IMWG) upravená kritéria pro stanovení diagnózy mnohočetného myelomu z roku 2003. Tato úprava byla nutná především z důvodu nových možností léčby (Maisnar, 2016). V nových kritériích IMWG byla pozměněna definice MM z nemoci definované symptomy na nemoc definovanou biomarkery (Landgren *et Rajkumar*, 2016). Dříve byly hlavními kritérii pro stanovení diagnózy MM počet plazmatických buněk v KD ≥ 10 %, případně přítomnost plazmocytomu, nález monoklonálního imunoglobulinu v séru či v moči a přítomnost orgánového poškození. Orgánové poškození odlišuje SMM od MM (Kyle *et Rajkumar*, 2009). Je shrnováno pod zkratkou CRAB (hyperkalcémie, selhání ledvin, anémie, kostní

změny) a bylo nyní rozšířeno o přítomnost více než 60 % klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni, poměr postižených/nepostižených volných řetězců v séru ≥ 100 a více jak jedno osteolytické ložisko na skeletu větší než 5 mm při vyšetření pomocí MRI. Každý z přidaných biomarkerů je spojen s 80% pravděpodobností progresu do symptomatického onemocnění s orgánovým poškozením. To umožňuje včasnou diagnózu před vznikem samotného orgánového poškození (Rajkumar, 2016). Rozšířená kritéria z roku 2014 pro diagnózu MM jsou shrnuta v Tabulce 1.

Tabulka 1: Definice mnohočetného myelomu dle upravených kritérií IMWG z roku 2014 (Upraveno dle imwg.myeloma.org)

1	Přítomnost plazmatických buněk ≥ 10 %/plazmocytom Doplněno přítomností jednoho nebo více druhů orgánového poškození a biomarkerů	
2	CRAB	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hyperkalcémie – Kalcium $>2,75$ mmol/l, nebo o 0,25 nad horní hranici normálního rozmezí. ○ Selhání ledvin – Kreatin >177 μmol/l, nebo clearance kreatinu <40 ml/min. ○ Anémie – Hemoglobin <100 g/l nebo 20 g/l pod dolní hranici normálního rozmezí. ○ Kostní změny – Lytická kostní ložiska, nebo osteoporóza s kompresivními frakturami.
	Biomarkery	<ul style="list-style-type: none"> ○ Přítomnost více než 60 % klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni. ○ Poměr postižených/nepostižených volných řetězců v séru ≥ 100. ○ Více jak jedno ložisko na skeletu větší než 5 mm při vyšetření pomocí MRI.

Stádia MM se určují na základě systému Durieho a Salmona a International staging systému (ISS). Durie-Salmon systém byl vytvořen roku 1975 a je založen na měření množství myelomových buněk a velikosti nádorové nálože, která koreluje s klinickými, laboratorními a rentgenovými rysy. Na základě tohoto odvození je možné určit I, II a III stádium MM v závislosti na stupni anemie, hyperkalcémie, hladin M proteinu v séru či v moči a kostních lézích. Pacienti jsou dále dělení do skupiny A, B dle přítomnosti/nepřítomnosti kreatinu v séru v koncentraci 2 mg/100 ml a více. Velkou nevýhodou tohoto systému je určování stádií na základě přítomnosti kostních lézí, jejichž detekce je velmi individuální.

Systém ISS je založen na určení množství β_2 -mikroglobulinu a hladin sérového albuminu. V roce 2015 byl (pod názvem R-ISS) revidován a rozšířen o koncentraci laktát dehydrogenázy (LDH) v séru a přítomnost rizikových cytogenetických změn. Na základě

týchto hodnot jsou určena 3 stádia onemocnění. Velká nevýhoda systému spočívá v nemožnosti použití na pacienty s MGUS či SMM. Systém je možno aplikovat pouze u symptomatického MM. Nemůže být použit pro určení nádorového zatížení ani pro určení terapeutické rizikové stratifikace. R-ISS systém a Durie Salmon systém je uveden v Tabulce 2.

Jelikož mají oba systémy své nevýhody, je doporučovaná jejich kombinace (Kyle *et Rajkumar*, 2009; Palumbo *et al.*, 2015).

Tabulka 2: Systém Durie-Salmon a R-ISS pro určení stádia MM (upraveno dle Leukemia and lymphoma society)

Stádium	Durie - Salmon systém	R-ISS systém
1	Všechny následující kritéria splněna: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hodnota hemoglobinu <100 g/l ○ Množství Kalcia v séru <3 mmol/l ○ Kostní struktura normální, nebo přítomnost solytárního plazmocytomu ○ Nízká produkce M komponentů (IgG <50 g/l, IgA <30 g/l) ○ Produkce lehkých řetězců do moči >4g/24hodin 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sérum β2-microglobulin <3.5 mg/l ○ Albumin >3.5 g/100 ml ○ Bez přítomnosti vysoce rizikových cytogenetických změn ○ Optimální hodnoty sérové LDH
2	Kritéria nezapadající do stádia 1 a 3 A – hodnota kreatinu v moči \leq 2 mg/100ml B – hodnota kreatinu v moči >2 mg/100ml	Kritéria nezapadající do stádia 1 a 3
3	Jedna nebo více podmínek splněných <ul style="list-style-type: none"> ○ Hodnota hemoglobinu <85 g/l ○ Množství Kalcia v séru >3 mmol/l ○ Více než 3 osteolytické kostní léze ○ Vysoká produkce M komponentů (IgG >70 g/l, IgA >50 g/l) ○ Produkce lehkých řetězců do moči >12 g/24hodin 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sérum β2-microglobulin >5.5 mg/l ○ Přítomnost vysoce rizikových cytogenetických změn ○ Zvýšené hodnoty LDH v séru

Legenda: Vysoce rizikové cytogenetické změny: přítomnost delece 17p a/nebo translokace t(4;14) nebo t(14;16)

3.3.4. Léčba

Léčba mnohočetného myelomu je v současné době jednou z nejdynamičtější se rozvíjejících odvětví hematologie. Od 90. let 20. století, kdy se začala používat k léčbě chemoterapie, dosahoval medián věku přežití pacientů 30 měsíců. Po zařazení vysokodávkové chemoterapie s autologní transplantací KD se medián přežití prodloužil o dalších 20 měsíců (Štork *et al.*, 2017).

Zavedení bortezomibu, thalidomidu a lenalidomidu představovalo další posun v léčbě jak mladších, tak starších pacientů, kteří nemohou podstoupit autologní transplantaci KD (Štork *et al.*, 2017). Bortezomib je proteasomový inhibitor, který je považován za významný lék podávaný pacientům s vysoce rizikovým MM. Thalidomid náleží do skupiny imunomodulačních léků (IMiD), který se používá hlavně u pacientů s renální insuficiencí. Jeho velkou nevýhodou je neurotoxicita. Lenalidomid je druhou, bezpečnější generací IMiD. Pacientům resistantním na lenalidomid může být podáván imunomodulační pomalidomid, který se zdá být více potentní (Dingli *et al.*, 2017). U relabovaných pacientů se jako velmi efektivní zdá nový lék – carfilzomib, inhibitor podjednotky 20S proteazomu. Velkou nevýhodou by mohlo být podezření na kardiotoxicitu. Mezi zcela nové preparáty patří inhibitor histondeacetyláz – panobinostat (Štork *et al.*, 2017).

Novou významnou skupinu látek se specifickým mechanismem účinku tvoří monoklonální protilátky. Vykazují minimální krátkodobou i dlouhodobou toxicitu, což dává možnost rozsáhlé kombinace s toxičtějšími léky jako je lenalidomid a dexametazon. Příkladem jsou daratumumab a elotuzumab, protilátky proti antigenu CD38, který je exprimován téměř na všech maligních plazmatických buňkách, zatímco u zdravých buněk se nevyskytuje (Jelínek *et al.*, 2015).

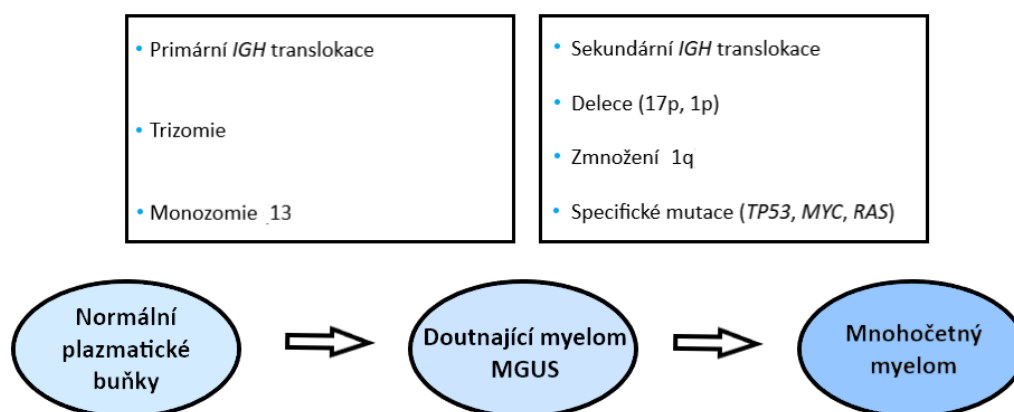
Navzdory vývoji nových léků, které významně prodlužují dobu remise, zůstává MM nevléčitelným onemocněním (Dingli *et al.*, 2017).

3.4. Cytogenetické změny u MM

Cytogenetické změny se vyskytují u 80-85 % pacientů (Grzasko *et al.*, 2017). Hrají klíčovou roli v určování prognózy onemocnění a nově jsou zahrnuty i do stážovacího systému R-ISS. Genetické změny u MM se dají rozdělit do 2 hlavních skupin: hyperdiploidie a nonhyperdiploidie. Nonhyperdiploidní MM (NH-MM) se dále rozděluje do 3 podskupin: hypodiploidní (44 chromozomů a méně), pseudodiploidní (45-46 chromozomů)

a hypetriplodní (75 chromozomů a více). U NH-MM je vysoká frekvence výskytu translokací *IGH* genu. Pro hyperdiploidní pacienty (H-MM) je charakteristické zmnožení lichých chromozomů. Nejčastěji se jedná o chromozomy 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 (Kjeldsen, 2016). Recentní studie ukazují, že H-MM se dá považovat za brzkou událost v klonální expanzi PC a lze ji proto detekovat již u pacientů s MGUS. H-MM je spojován s příznivější prognózou (Barillé-Nion *et al.*, 2003). Přestože nejsou cytogenetické změny zahrnuté v diagnostických kritériích pro MM, hrají důležitou roli v určování odpovědi na chemoterapii, odhadu trvání remise a určení doby přežití (Kjeldsen, 2016). Výskyt chromozomálních změn v různých stádiích MM je zobrazen na Obrázku 2.

Obrázek 2: Výskyt chromozomálních abnormalit v průběhu vývoje MM (Upraveno dle Roy *et al.*, 2018)



3.4.1. Početní změny chromozomů

Početní změny zahrnují jak zmnožení (trizomie), tak ztrátu chromozomů (monozomie). Monozomie postihuje nejčastěji chromozom 13. Monozomie 13, respektive delece 13q je brzkou událostí v patogenezi MM a je popisována až u 50 % pacientů ve stádiu MGUS (Mohty *et Harousseau*, 2015; Rajan *et Rajkumar*, 2015). Delece genu *RBI* (13q14) je považována za marker monozomie chromozomu 13, protože u 90 % pacientů s delecí *RBI* je potvrzena ztráta celého chromozomu. Delece 13q patří mezi nejčastěji detekovanou změnu u pacientů s MM. Při klasickém cytogenetickém vyšetření je detekována u 15-20 %, při použití metody FISH až u poloviny nově diagnostikovaných pacientů (Kuglík *et al.*, 2008). Celkově jsou delece chromozomu 13 považovány za špatný prognostický faktor, pokud jsou detekovány klasickou cytogenetickou analýzou (Barillé-Nion *et al.*, 2003). Další častou monozomií je monozomie chromozomu 17, která je

považována za špatný prognostický faktor ve vývoji MM (Mohty *et Harousseau*, 2015), (Rajan *et Rajkumar*, 2015). U žen je často detekována i monozomie chromozomu X, která se u mužské populace nevyskytuje z důvodu neživotnosti buněk s absencí chromozomu X (Sticca *et al.*, 2016).

Početní změny v podobě trizomií postihují hlavně liché chromozomy. Takové trizomie jsou pro MM typické, u žádného jiného maligního onemocnění se nevyskytují (Mohty *et Harousseau*, 2015).

3.4.2. Primární IGH Translokace

Translokace zahrnující gen *IGH* (14q32) se vyskytují u 30-40 % pacientů. Tyto translokace vznikají díky nehomologní rekombinaci *IGH* genu a jsou považovány za časnou událost. Translokace má za následek deregulaci exprese partnerských genů, díky jejich přemístění do blízkosti zesilovačů transkripce *IGH* genu (Balcárková *et al.*, 2016), (Sawyer, 2011). Mezi nejčastější partnerské geny patří proto-onkogeny, jako například geny pro proteiny rodiny cyklinů D (cyklin D1, D2 a D3), pro fibroblastový růstový faktor (gen *FGFR3*) a gen *MAF* (Kjeldsen, 2016). Výskyt *IGH* translokací se během progresu MGUS do MM zvyšuje z 50 % na 90 %. Translokace zahrnující lehké řetězce imunoglobulinu mají četnost mnohonásobně nižší s 10% výskytem u MGUS a 20% výskytem u MM (Sawyer, 2011).

Translokace t(4;14)(p16;q32)

U 15-20 % nemocných se vyskytuje t(4;14) a je spojena se středně nepříznivou prognózou. Tato translokace má za výsledek deregulaci dvou genů – *MMSET* na derivovaném chromozomu 4 a *FGFR3* na derivovaném chromozomu 14. Protein MMSET je chromatin remodelující protein s histon methyltransferázovou aktivitou. Buňky s translokací zahrnující *MMSET* mají sníženou schopnost adheze, mají zpomalený buněčný růst a sníženou schopnost navodit apoptózu. Produkt genu *FGFR3* je zapojen do přenosu signálu regulujícího růst a diferenciaci buněk. Jeho role v patogenezi je však zatím neznámá (Balcárková *et al.*, 2016). Gen *FGFR* je v translokacích t(4;14) postižen pouze v 70 % případů, díky ztrátě derivovaného chromozomu 14. Z tohoto zjištění vyplývá, že hlavním molekulárním cílem translokace je spíše gen *MMSET*. (Corre *et al.*, 2015).

Translokace t(11;14)(q13;q32)

Tato translokace bývá detekována u 20 % pacientů (Kuglík *et al.*, 2008). Je spojená s dobrou prognózou a zahrnuje gen *CCND1* (Barillé-Nion *et al.*, 2003). Tento gen kóduje protein cyklin D1, který společně s dalšími cykliny reguluje průběh buněčného cyklu a vstup do apoptózy. Za normálních okolností je cyklin D1 přítomen pouze u proliferujících progenitorů B buněk. Při t(11;14) dochází k jeho overexpresi. Nepřímo může docházet k deregulaci cyklinu D1 prostřednictvím t(14;16) a t(14;20) (Kubiczková *et al.*, 2013). Translokace t(11;14) a t(4;14) se společně nevyskytují (Rajan *et Rajkumar*, 2015). U 2 % nemocných bývá detekována příbuzná t(6;14) zahrnující gen pro cyklin D3 (*CCND3*), který je lokalizován na chromozomu 6 (Zhan *et al.*, 2006).

Translokace t(14;16)(q32;q23)

Výsledkem t(14;16) je deregulace *c-MAF* proto-onkogenu. Gen *c-MAF* náleží do rodiny *MAF* transkripčních faktorů. Tato translokace je spojována s agresivnějším průběhem nemoci a kratší dobou přežití. Vyskytuje se přibližně u 6-7 % pacientů. Translokaci t(14;16) je podobná translokace t(14;20), která dereguluje příbuzný gen *MAFB*. Je také spojena se špatnou prognózou a vyskytuje se u 2 % pacientů s MM (Barillé-Nion *et al.*, 2003; Sawyer, 2011).

3.4.3. Delece genu TP53

Gen *TP53* je lokalizován na chromozomu 17 (v pruhu p13) Protein p53 hraje důležitou roli v kontrole proliferace, diferenciaci a apoptózy. Nejčastější příčinou inaktivace je monoalelická delece krátkého ramene chromozomu 17, která je často doprovázena mutací druhé alely genu *TP53*. Metodou FISH bývá detekována u 5-34 % případů s nově diagnostikovaným MM a u 40 % pacientů v pokročilém stádiu onemocnění (Mičková *et al.*, 2014). Delece 17p je spojována se špatnou prognózou (Lentzch, 2013).

3.4.4. Abnormality chromosomu 1

Abnormality chromozomu 1 se řadí mezi sekundární cytogenetické změny u MM a jsou spojovány s negativní prognózou. Zahrnují delece krátkého ramene (1p) a zmnožení dlouhého ramene (1q) (Rajan *et* Rajkumar, 2015). V případě krátkého ramene 1p se jedná konkrétně o variabilní intersticiální delece v oblasti regionu 1p13 až 1q31. Zmnožení 1q se u pacientů s MGUS téměř nevyskytuje, bývá nalezeno u 40 % pacientů s novou diagnózou a až 70 % pacientů v progresi nebo relapsu MM (Sawyer, 2011). Z nízkého výskytu u MGUS vyplývá, že tato změna může hrát roli v progresi MGUS do MM (Rajan *et* Rajkumar, 2015). Zmnožení 1q konstitutivně zahrnuje oblast 1q21. V této oblasti se nachází gen *CKS1B* kódující protein účastnící se ubiquitinace proteinů. Jeho overexprese bývá spojována s rezistencí na léky jako např. bortezomib (Němec *et al.*, 2010). Abnormality ramene 1q se vyskytují nejčastěji jako nebalancované translokace, amplifikace a jumping translokace. Mnoho studií prokázalo společný výskyt zmnožení 1q společně s delecí 13q a 17p (Gunjan *et al.*, 2017).

3.4.5. Sekundární translokace

Na rozdíl od primárních translokací představují sekundární translokace události, ke kterým dochází v pozdějších stádiích onemocnění. Nejčastější translokací je t(8;14), která ve 40 % nezahrnuje gen *IGH* umístěný na 14q32 (Dib *et al.*, 2008). Tato translokace vykazuje stejný výskyt jak u hyperdiploidního, tak nonhyperdiploidního MM (Sawyer, 2011).

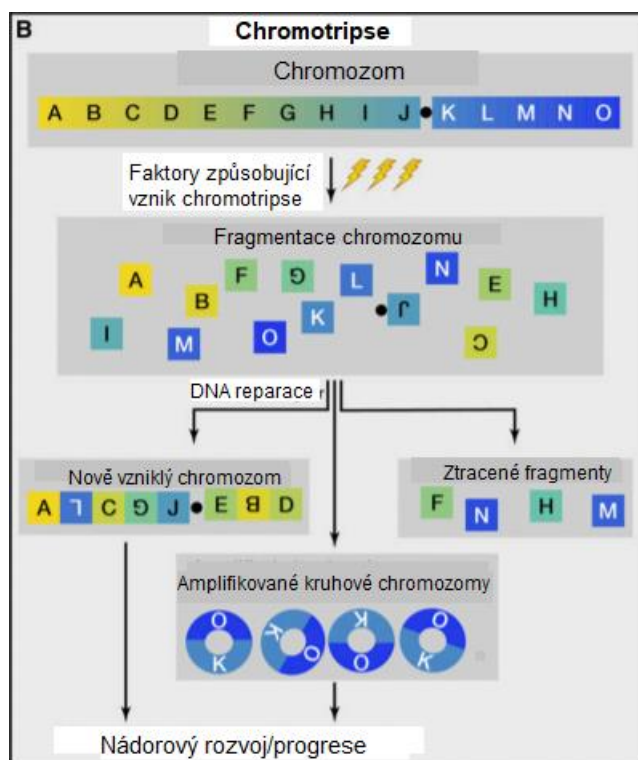
Typicky upregulovaným genem je *MYC* (8q24). Tento gen kóduje transkripční faktor s klíčovou rolí v regulaci růstu buněk, jejich proliferaci, translaci proteinů, metabolismu, apoptóze a tumorogenezi. Jeho zvýšená exprese je mnohdy spojená s vysokým množstvím sérového β 2-mikroglobulinu, který je indikátorem špatné prognózy. Deregulace genu *MYC* je spojená s progresí onemocnění. U pacientů s MGUS se prakticky nevyskytuje, zatímco u MM až v 15 % (Prideaux *et al.*, 2014; Mlynářčiková *et al.*, 2016).

Kromě *IGH* mohou být translokačními partnery genu *MYC* i geny pro lehké řetězce imunoglobulinů *IGK* (2p11) a *IGL* (22q11). V těchto případech mluvíme o t(2;8) a t(8;22) (Walker *et al.*, 2014). Následky deregulace genu *MYC* nejsou zcela objasněny, ale jsou spojeny s nadměrnou buněčnou proliferací (Sawyer, 2011).

3.4.6. Chromotripse

Chromotripse (CTH) je jednostupňová genová událost postihující jeden či několik málo chromozomů, případně pouze rameno jednoho chromozomu (Fontana *et al.*, 2018). Klíčovým rysem chromotripse je fragmentace chromozomů, utvoření krátkých úseků DNA, jejich přeskupování a opětovné spojování mechanismem nehomologního spojování konců, přičemž může docházet ke ztrátám některých úseků. V některých případech může docházet k tvorbě malých kruhových chromozomů, případně ke ztrátě heterozygosity (LOH). V důsledku masivních změn DNA vykazují chromozomy postižené chromotripsí charakteristicky většinou 2-3 kopie opakujících se určitých úseků (Korbel *et al.*, 2013; Berry *et al.*, 2017; Smetana *et al.*, 2018). Chromotripse se vyskytuje u rozličných druhů malignit od akutní myeloidní leukemie, vrozených poruch až po hematologické malignity včetně MM (Fontana *et al.*, 2018). Studiemi bylo prokázáno, že tato událost je spojena s extrémně špatnou prognózou u většiny nádorů. U MM je CTH uváděna jako vzácná chromozomální aberace s frekvencí výskytu 1 % a je spojena s krátkým přežíváním u nově diagnostikovaných pacientů (Smetana *et al.*, 2018). Princip chromotripse je zobrazen na Obrázku 3.

Obrázek 3: Princip chromotripse (upraveno dle Korbel *et al.*, 2013)



3.4.7. Ztráta heterozygotity (LOH)

Jedná se o častou abnormalitu vyskytující se u mnoha typů nádorů, kdy dochází ke změně z heterozygotní konstituce alel do konstituce zdánlivě homozygotní. Obecně LOH zahrnuje dvě události – copy number losses LOH (CNL-LOH), při které dochází ke ztrátě genetického materiálu a copy number neutral LOH (CNN-LOH), při které ke ztrátě genetického materiálu nedochází. CNN-LOH se vyskytuje nejčastěji jako uniparentální diozomie při dělení buněk, kdy dojde k duplikaci chromozomu od jednoho z rodičů a druhý chromozom je ztracen. Druhou často se vyskytující možností je vznik díky genové konverzi. LOH bývá spojována se ztrátami funkce určitého genu (například nádorového supresoru). Dle Knudsonova modelu je tento jev tzv. druhý genetický zásah, při kterém je ztracena funkční alela a zůstává pouze duplikovaná mutovaná alela daného genu, která neprodukuje funkční produkt. CNN-LOH je považována za možný mechanismus inaktivace tumor supresorových genů u pacientů s MM (Walker *et Morgan*, 2006; Ryland *et al.*, 2015).

3.4.8. Specifické genové mutace (geny RAS, MYC, TP53, BRAF)

U pacientů s MM se vyskytuje málo opakujících se mutací konkrétních genů s potenciálně patologickým významem. Mezi nejběžnější patří mutace genu *RAS*, *MYC*, *TP53* a *BRAF* (Bolli *et al.*, 2014).

Rodina proto-onkogenů *RAS* zahrnuje geny *KRAS*, *NRAS*, *HRAS* a další jim podobné geny. Tyto geny kódují Ras proteiny, které jsou klíčovými komponenty signálních drah vedoucích k regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a buněčné smrti (McCormick, 1996; Wittinghofer, 1998). Aktivační mutace genů *RAS* se vyskytují u 40 % pacientů. Mutace se nacházejí v zejména v genech *NRAS* a *KRAS*. Zatímco mutace *KRAS* jsou spojené s kratším přežíváním, mutace *NRAS* souvisí s progresí do agresivního stádia MM a pravděpodobně i přechodem MGUS do MM (Barillé-Nion *et al.*, 2003). Mutace v *RAS* genech se většinou vyskytují u pacientů s MM, u pacientů s MGUS se vyskytují pouze v 5 % případů (Provan *et Gribben*, 2010).

Aktivace genu *MYC* mutací je pozorována u nově diagnostikovaných pacientů s MM, zatímco u pacientů s MGUS se nevyskytuje. Je tedy považována za možný spouštěč přechodu z MGUS do MM. Aktivace genu *MYC* je často provázána mutací *RAS* genů (Provan *et Gribben*, 2010).

Přítomnost mutace *TP53* je spojená s vývojem a progresí onemocnění. Bylo zjištěno, že mutace genu *TP53* se u MM vyskytuje u méně než 20 % pacientů v pokročilém stádiu onemocnění. Předpokládá se, že mutace tohoto genu jsou spíše pozdní událost ve vývoji onemocnění a pro prognózu mají malým význam (Drach *et al.*, 1998).

Do rodin serin threoninových kináz patří geny *ARAF*, *BRAF* a *CRAF*, které se účastní přenosu signálu v MAPK dráze. Protein BRAF patří mezi nejčastěji mutované kinázy u nádorů. Mutace se vyskytuje u 6 % onkologických pacientů, u pacientů s melanomem až ve 40-50 % (Dankner *et al.*, 2018). U pacientů s MM se tato aktivační mutace vyskytuje u 4 % pacientů, přičemž nejčastější zasahuje *BRAF V600E*, která je spojována s agresivnější formou MM a kratším přežíváním (Andrulis *et al.*, 2013).

3.5. Metody detekce změn u MM

Vyšetření genetických změn u MM je podobně jako u jiných hematoonkologických malignit založeno na klasické analýze karyotypu, nejčastěji pomocí G-pruhování. Mluvíme o konvenční cytogenetice metafázních chromozomů. Druhou možností je využití molekulárně cytogenetických technik jako je FISH nebo aCGH (Kuglík *et al.*, 2008).

3.5.1. G-pruhování

Jedná se o techniku barvení metafázních chromozomů, která umožňuje identifikaci jednotlivých chromozomů v genomu, případných strukturních a početních změn. G-pruhování je nejčastěji používanou metodou pruhování v klinické cytogenetice (Schreck *et Distèche*, 2001). Postup zahrnuje ošetření chromozomů trypsinem, který uvolní strukturu chromatinu a jejich následné obarvení Giemsovým barvivem. Oblasti heterochromatinu bohaté na AT báze se v mikroskopu jeví jako tmavé pruhy na chromozomech. Méně kondenzovaný chromatin (bohatý na GC oblasti) vytváří světlé pruhy. Po obarvení dochází k vytvoření karyogramů, kdy sestava pruhů je typická pro každý chromozom. Takto lze rozlišit změny o velikosti několik Mb. G-pruhováním lze jednoduše detekovat např. aneuploidie či translokace (O'Connor, 2008). G-pruhování má stejně jako další metody konvenční genetiky značná omezení. Vyšetření u MM je limitováno nízkou infiltrací KD nádorovými plazmatickými buňkami společně s nízkým mitotickým indexem a špatnou morfologií chromozomů (Kuglík *et al.*, 2008).

3.5.2. Molekulárně cytogenetická analýza

Molekulárně cytogenetické metody umožňují citlivější detekci chromozomálních změn, a to jak na úrovni chromozomů, tak na úrovni genů. Základ všech metod představuje *in situ* hybridizace, která umožňuje detekovat určité genové oblasti přímo na cytogenetickém preparátu pomocí specificky značených DNA sond. Techniky založené na *in situ* hybridizaci jako mnohobarevná FISH (mFISH) a array komparativní genová hybridizace (aCGH) pak umožňují rychlou analýzu celého genomu (Kočárek *et al.*, 2010). Kombinací metod FISH a aCGH lze dosáhnout velkého záchyty jak *IGH* translokací, tak početních změn chromozomů u pacientů s MM (Rack *et al.*, 2016).

3.5.2.1. FISH

Metoda využívající pro značení sond fluorescenční barvivo. Takto značená sonda (fluorofor) se naváže na cílenou komplementární DNA a je detekována fluorescenčním mikroskopem. Sonda bývá značena přímo inkorporací značeného nukleotidového prekurzoru (Strachan *et al.*, 2011). Metoda umožňuje detekovat změny části chromozomů, ke kterému je sonda komplementární. Při jedné FISH lze použít maximálně 2-3 různě značené sondy (Kočárek *et al.*, 2010). Analýza pomocí metody FISH zajišťuje záchyt aberací až u 90 % pacientů s MM (Rack *et al.*, 2016). FISH může být prováděna i na interfázních jádrech (i-FISH). Tato modifikace řeší případný problém s malým počtem mitóz (Uhriq *et al.*, 1999), (Kuglík *et al.*, 2008).

3.5.2.2. Mnohobarevná FISH (m-FISH)

Umožňuje detekci změn bez nutného zacílení sondy na konkrétní místo v genomu. K detekci jsou užívány rozdílně značené malovací sondy. Rozdílné sondy, spolu s jejich kombinacemi umožňují rozlišit všech 24 lidských chromozomů (Kočárek *et al.*, 2010). K detekci navázaných sond (vyrobených z cyaninových barviv) se využívá fluorescenčního mikroskopu, sad specifických fluorescenčních filtrů a speciálního počítačového softwaru. Software přiřazuje každému chromozomu pseudobarvu dle poměru navázaných sond (Kearney, 2006). Metoda m-FISH se používá hlavně k detekci složitějších přestaveb zahrnující větší počet chromozomů. Podmínkou pro její provedení je přítomnost metafázních chromozomů a získání dobře pozorovatelných mitóz (Kočárek *et al.*, 2010).

3.5.2.3. FICTION

Metoda FICTION (Icg-FISH) je modifikací metody FISH, která umožňuje vizualizaci pouze maligních plazmatických buněk a tím zvyšuje záchyt chromozomových aberací u pacientů s MM. Nejprve dochází ke značení cytoplazmy maligních PB pomocí specifických fluorescenčně značených protilátek proti lehkému cytoplazmatickému imunoglobulinu (κ/λ). Následuje běžná analýza FISH. Při analýze cytogenetických změn u MM se jedná o výhodnou metodu, jelikož počet patologických PB u pacientů může být velmi nízký. U těchto pacientů nemusí být chromozomové změny pomocí klasické FISH odhaleny (Kuglík *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2012; Gole *et al.*, 2014).

3.5.2.4. Array comparativní genomová hybridizace (aCGH)

Základem metody je komparativní genomová hybridizace, která umožňuje analýzu chromozomů bez nutnosti kultivace. (Kočárek *et al.*, 2010). aCGH se pak řadí mezi čipové techniky – mikroarraye (Kočárek *et al.*, 2010). Dva různě značené vzorky (testovaná DNA a kontrolní) jsou hybridizovány na čip, který obsahuje navázané oligonukleotidy představující úseky genomu. Metoda dokáže detekovat ztrátu či zmnožení genetického materiálu o velikosti cca 1 kb (García-Acero *et al.*, 2018). Pro úspěšnou aplikaci této metody je podmínkou vysoká čistota a dostatečné množství DNA (Kuglík *et al.*, 2008), Pomocí aCGH jsou nalezeny změny až u 98 % pacientů s MM (Rack *et al.*, 2016).

3.5.3. MACS

Magnetický buněčný sorter (Magnetically actuated cell sorter, MACS) je mikrofluidní technika, pracující na principu magnetické separace buněk. Umožňuje izolaci konkrétní populace buněk z heterogenní suspenze. Buňky jsou kultivovány s magnetickými kuličkami s navázanou protilátkou proti konkrétnímu buněčnému antigenu. Magnetické kuličky s navázanými buňkami jsou poté zachyceny v koloně. Po odstranění kolony z magnetického pole může být analyzován konkrétní typ buněk.

U MM umožňuje metoda MACS izolovat buňky s určitým povrchovým CD znakem pomocí monoklonální protilátky navázané na paramagnetické partikuly (Fišerová *et al.*, 2001). První možnost využívá navázání protilátky na povrchové antigeny buněk, které nejsou žádoucí (negativní selekce). Tím dojde k vychytání všech buněk kromě buněk

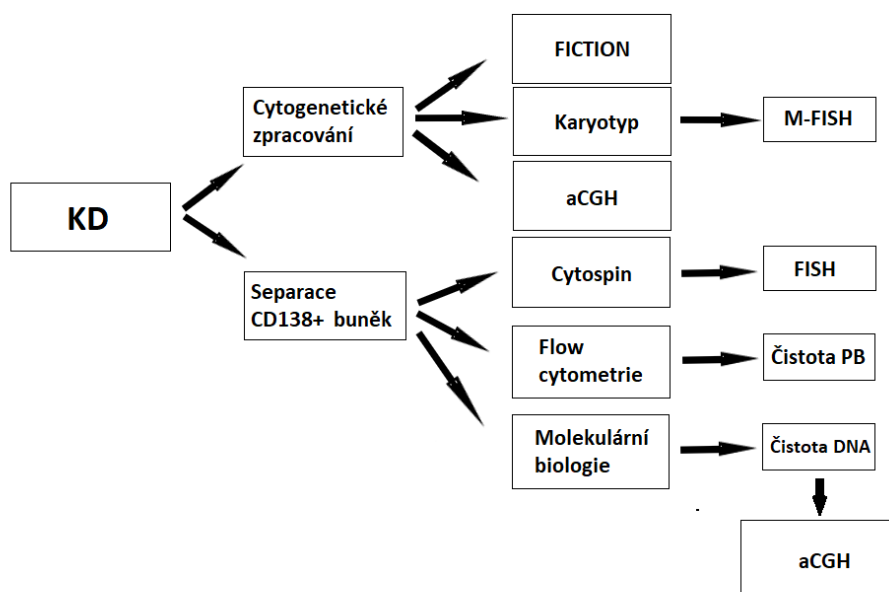
plazmatických. Druhou možností je pozitivní selekce, při které se protilátky váží s povrchovými antigeny žádoucích PB a tím dojde k jejich vyloučení. Při pozitivní selekci se využívá přítomnosti syndekanu-1 (CD138+), který je přítomen na všech PB. Jedná se o transmembránový heparansulfátový proteoglykan, který je běžně exprimován jak normálními, tak maligními PB v KD, případně v periferní krvi v pozdních stádiích MM nebo při plazmocelulární leukémii. (Čumová *et al.*, 2010), (Burešová *et al.*, 2011).

Protilátka nemusí být navázána pouze na magnetickou částici. V případě metody FACS (fluorescence-activated cell sorting) se využívá i navázání na fluorescenční molekulu. Značené buňky jsou následně sortovány pomocí průtokového cytometru (Bhagat *et al.*, 2010).

4. Praktická část

Pro molekulárně cytogenetickou analýzu metodou byla použita kostní dřev (KD), která byla odebrána od pacientů s MM na Hemato-onkologické klinice (HOK) Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL). Všechny vzorky KD byly dodávány do Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL s protisrážlivým činidlem (lithium heparin), byly kultivovány a zpracovány dle standardních postupů. Takto zpracované vzorky jsem použila pro izolaci DNA z fixovaných buněk pomocí fenol-chloroformové metody. Druhým materiálem byla nezpracovaná KD, u které jsem provedla magnetickou separaci a získala tak CD138+ plazmatické buňky. Separace CD138+ buněk byla provedena na 39 vzorcích, 12 vzorků bylo vyšetřeno z plné kostní dřevě. Souhrnné schéma vyšetření KD v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL je uvedeno na Obrázku 4.

Obrázek 4: Souhrnné schéma vyšetření KD pacientů s MM na HOK FNOL Olomouc



4.1. Materiál a metody

4.1.1. Magnetická separace CD138+ buněk pomocí Whole Blood Column Kitu

Přístroje:

Pipetovací nástavec Pipette Controller PH01 (Accumax, Gujatar, Indie), Manuální separátor MidiMACS (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Německo), mraznička, lednička (obojí Labnet International, Edison, NJ, USA), Centrifuga Jouan CR4.22 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), mikropipety (Gilson, Middleton, WI, USA)

Spotřební materiál:

Kolona MS Column (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Německo), filtry MACSsmart strainers a MACSsmart filters (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Německo), pasturovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), centrifugační zkumavky 15ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), centrifugační zkumavky 50ml (TPP, Trasadingen, Švýcarsko), 1,5ml plastové mikrozukavky (Eppendorf, Hamburg, Německo), Sérologické pipety 10ml (TPP, Trasadingen, Švýcarsko), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA)

Chemikálie a roztoky:

IMDM médium (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), magnetické kuličky MACSprep™ Multiple myeloma CD138 (MicroBreads Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Německo) separační pufr (100 ml 10x PBS, 50 ml 10% BSA, 4 ml 0,5 M EDTA a 846 ml H₂O), Whole Blood Column eluční pufr (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Německo)

Příprava buněk kostní dřene

Postup:

1. KD byla zředěna IMDM médiem v poměru 1:1.
2. KD byla přefiltrována přes filtr (velikost filtru 100 µm) předem navlhčený separačním pufrům do 50ml centrifugační zkumavky.
3. Obsah zkumavky byl centrifugován při 440 g, 10 minut při 20 °C bez brzdy.
4. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v separačním pufru do 2x objemu původní KD.
5. KD byla přefiltrována přes nylonový filtr (30 µm) do 15ml zkumavky.

Magnetické značení

Postup:

1. Ke KD byly přidány magnetické kuličky v množství cca 50 μ l na 1 ml původní KD.
2. Obsah zkumavky byl promíchán a inkubován 15 minut při 2-8 °C.
3. Po inkubaci byla zkumavka doplněna separačním pufrem do plného objemu a centrifugována při 440 g, 10 minut při 20 °C bez brzdy.
4. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a pelet resuspendován v separačním pufru do celkového objemu cca 3 ml.

Magnetická separace

Postup:

1. Do magnetického pole separátoru byla umístěna kolona. Pod kolonu byla umístěna 50ml zkumavka. Kolona byla propláchnuta 3 ml separačního pufru.
2. Na takto připravenou kolonu byla nanášena KD a následně byla kolona 2x propláchnuta 2 ml separačního pufru.
3. Kolona byla přemístěna do 15ml zkumavky a byla propláchnuta 4 ml elučního pufru. Okamžitě po nanášení byl pufr protlačen pístem přes kolonu.
4. Kolona byla přemístěna do čisté 15ml zkumavky a byl opakován krok č.3.

4.1.2. Příprava skel s buňkami CD138+ pro analýzu metodou FISH

Přístroje:

Cytocentrifuga CytoFuge 2 M801-22 (StatSpin, Westwood, MA, USA), mikropipety (Gilson, Middleton, WI, USA)

Spotřební materiál:

podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), příslušenství k cytocentrifuze, špičky (Gilson, Middleton, WI, USA)

Chemikálie a roztoky:

Methanol:kyselina octová, 3:1 (příprava), pepsin, HCl, deionizovaná H₂O (HOK), 10x PBS pufr (lékárna FNOL), postfixační roztok (lékárna FNOL)

Postup

1. Z izolované frakce CD138+ buněk bylo odebráno 100 μ l a bylo nakapáno na připravené sklo do cytopsinu.
2. Po vyndání z cytopsinu bylo na sklo nakapáno pár kapek metanol:kyselina octová (3:1) a ponecháno cca 10 minut. Postup byl opakován.
3. Sklo bylo usušeno při pokojové teplotě.
4. Koplina obsahující 1 ml 1M HCl a 99 ml H₂O byla vyhřáta na 37 °C.
5. Do kopliny bylo přidáno 500 μ l pepsinu.
6. Sklo bylo vloženo do kopliny a inkubováno po dobu 7 minut.
7. Sklo bylo opláchnuto v PBS po dobu 3 minut.
8. Na sklo bylo nakapáno 50 μ l postfixačního roztoku, byl přiložen parafilm a 10 minut bylo inkubováno při pokojové teplotě.
9. Parafilm byl sundán a sklo bylo inkubováno 3 minuty v PBS.
10. Sklo bylo opláchnuto v ethanolové řadě (70%, 80%, 96%) po dvou minutách v každém alkoholu.
11. Sklo bylo usušeno při pokojové teplotě.
12. Byla přidána specifická sonda a sklo bylo se sondou kodenaturováno dle návodu přiloženého výrobcem konkrétní sondy.

4.1.3. Izolace DNA z CD138+ frakce pomocí kitu

Izolace byla provedena pomocí kitu Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, Germany). Postup byl v některých krocích upraven dle množství a kvality vzorku. Izolace byla prováděna v laboratoři Molekulární genetiky FNOL.

Přístroje:

Stolní centrifuga Centrifuge 5424 R (Eppendorf, Hamburg, Německo), centrifuga Megafuge 1.0 R (Heraeus Sepatech, Hanau, Německo), mikropipety (Gilson, Middleton, WI, USA), kývačka MIX 30 (Tool, Praha, ČR)

Spotřební materiál:

pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), Sérologické pipety 10ml (TPP, Trasadingen, Švýcarsko), 2ml plastové mikrozkušavky (Eppendorf, Hamburg, Německo), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA)

Chemikálie a roztoky:

Glycerol (Invitrogen, Waltham, MA, USA), Izopropanol, 70% ethanol, 10 mM TRIS (vše lékárna FNOL)

Postup:

1. Obě zkumavky obsahující buňky CD138+ byly stočeny na 3500 rpm, 5 minut, při 4-8 °C.
2. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v malém množství supernatantu.
3. Obsah obou zkumavek byl přepipetován do 2ml mikrozkušavky.
4. Mikrozkušavka byla centrifugována při 1000 rpm, 2 minuty.
5. Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno cca 150 µl Cell Lysis Solution dle množství sedimentu. Pomocí pasteurovy pipety byl obsah zkumavky homogenizován.
6. Bylo přidáno cca 50 µl Protein Precipitation Solution a obsah zkumavky byl 20 sekund vortexován a následně stočen při 14 000 rpm, 5 minut.
7. Do nové mikrozkušavky byl napipetován izopropanol v množství stejném jako Cell Lysis Solution. K izopropanolu byl přidán supernatant pro vysrážení DNA.
8. Pokud nedošlo ke sražení DNA, byl přidán 1 µl glycerolu a zkumavka byla umístěna přes noc do lednice.
9. Zkušavka s vysráženou DNA byla centrifugována při 14 000 rpm, 2 minuty.
10. Supernatant byl odstraněn a byl přidán 1 ml vychlazeného 70% ethanolu.
11. Zkušavka byla centrifugována při 10 000 rpm, 2 minuty. Tento krok byl jednou zopakován.
12. Supernatant byl odstraněn a zkumavka 15 sekund centrifugována při pokojové teplotě. Případné zbytky alkoholu byly odstraněny Pasteurovou pipetou.
13. Pelet DNA byl sušen při pokojové teplotě cca 60 minut.
14. K vysušenému peletu byl přidán 10 mM TRIS (množství dle velikosti peletu).
15. Pelet DNA byl rozpuštěn při pokojové teplotě.

4.1.4. Izolace DNA z fixovaných buněk fenol-chloroformovou metodou

Přístroje:

centrifuga Biofuge 22R (Heracus Sepatech, Hanau, Německo), kývačka MIX 30 (Tool, Praha, ČR), mrazák, Termoblok Dry Block Thermostat Bio TDB-100 (BioSan, Riga, Lotyšsko), mikropipety (Gilson, Middleton, WI, USA)

Spotřební materiál:

2ml plastové mikrozkušavky (Eppendorf, Hamburg, Německo), pasturovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA)

Chemikálie a roztoky:

10x PBS pufr, STE pufr, 10% SDS, Proteináza K, Fenol + 10mM TRIS, chloroform-izoamylalkohol (24:1), izopropanol, 70% ethanol, 10mM TRIS (vše lékárna FNOL)

Postup:

1. Fixovaná směs buněk byla centrifugována 3 minuty při 10 000 otáčkách.
2. Supernatant byl odstraněn, sediment resuspendován v 1 ml 1x PBS a centrifugován při 10 000 rpm, 3 minuty.
3. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 0,5 ml STE pufr chlazeném na 4-8 °C.
4. Bylo přidáno 30 µl 10% SDS a 30 µl Proteinázy K.
5. Obsah byl inkubován do druhého dne při 37 °C.
6. Druhý den bylo přidáno 0,5 ml fenolu syceného 10 mM TRIS, pH 8 o teplotě 4-8 °C a obsah byl protřepán a dán na kývačku na 10 minut při pokojové teplotě.
7. Zkušavka byla centrifugována při 13 000 rpm, 10 minut (4-8 °C).
8. 2/3 až celý objem horní vrstvy byl přenesen do čisté mikrozkušavky.
9. Bylo přidáno 0,5 ml směsi chloroform-izoamylalkoholu (24:1) a obsah byl promíchán.
10. Zkušavka byla dána na kývačku na 10 minut při pokojové teplotě.
11. Zkušavka byla centrifugována při 13000 rpm, 10 minut (4-8 °C).
12. 2/3 až celý objem horní vrstvy byl přenesen do čisté mikrozkušavky.
13. Bylo přidáno 0,5 ml chlazeného izopropanolu a obsah se nechal precipitovat cca 10 minut v mrazáku.
14. Zkušavka byla centrifugována při 14000 rpm, 5 minut (při 4-8 °C).

15. Supernatant byl odstraněn a pelet 2x propláchnut 70% vychlazeným ethanolem.
16. Zkumavka byla centrifugována při 14 000 rpm, 5 minut (při 4-8 °C).
17. Supernatant byl odstraněn a zbytek alkoholu odsán pasteurovou pipetou.
18. Pelet DNA byl sušen při pokojové teplotě (cca 30 minut).
19. K vysušenému peletu bylo přidáno 50 μ l 10mM TRIS.
20. Pelet DNA byl rozpouštěn do druhého dne při pokojové teplotě.

4.1.5. Kontrola kvality DNA

Po izolaci DNA a před přípravou vzorků pro analýzu aCGH je nutné změřit koncentraci získané DNA. K tomu se používá nejčastěji přístroj QUBIT, Nanodrop a gelová elektroforéza. Všechny tyto metody jsem v průběhu své práce využila.

Měření pomocí Qubitu

Přístroj Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Waltham, MA, USA) pracuje na principu fluorimetrie. Snímáním fluorescence barviv, které se specificky naváží na DNA, se snižuje vliv kontaminantů na určení koncentrace, a to umožňuje velice přesně měření. Přístroj umožňuje použití vzorku o objemu 1 μ l ve velmi vysokém zředění. (příručka Thermo Scientific, Qubit). Qubit měří pouze koncentraci dvouvláknové dsDNA. Je nutné užití standardů. Měření pomocí Qubitu jsem prováděla dle návodu přiloženého výrobcem.

Měření pomocí NanoDropu

Na principu spektrometrie pracuje přístroj NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), který spojuje kombinaci optických vláken a povrchového napětí, což umožňuje měření koncentrace vzorku bez použití kyvet nebo kapilár. Umožňuje provádět měření ve velkých koncentračních rozmezích (do 3700 ng/ μ l) bez nutnosti ředění, s velmi malým množstvím vzorku (1-2 μ l) (Desjardins *et* Conklin, 2010; příručka Thermo Scientific, NanoDrop). NanoDrop je schopen měřit koncentraci fragmentované DNA a dokáže identifikovat kontaminaci RNA a bílkoviny. Hodnota nekontaminované DNA dosahuje hodnot 1,8-2 při poměru vlnových délek A260/280. Příprava vzorků i samotné měření proběhlo vždy dle návodu výrobce. Koncentrace DNA by v ideálním případě neměla klesnout pod 50 ng/ μ l.

Kontrola celistvosti DNA pomocí gelové elektroforézy

Gelová elektroforéza je základní metodou pro analýzu DNA. Princip metody je založen na migraci DNA v gelové matrici. Pohyb molekul je zajištěn elektrickým proudem, kdy hybnost molekuly směrem k anodě probíhá díky zápornému náboji této molekuly. Separace molekul DNA je pak závislá na velikosti DNA. Separované fragmenty jsou následně vizualizovány, nejčastěji pomocí ethidium bromidu. (Magdeldin, 2012).

Kontrolu kvality mnou izolované DNA jsem standartně prováděla pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Ověřovala jsem množství DNA a míru fragmentace. Samotná elektroforéza byla prováděna dle standartních postupů Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky.

4.1.6. Komparativní genomová hybridizace na čipu

DNA všech pacientů byla vyšetřena na přítomnost chromozomových aberací metodou aCGH pomocí čipu Agilent 4X180K SNP.

Přístroje:

cycler ProFlex™ 96-well PCR Systém (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornie, USA), hybridizační pec Hybridization Oven 1012 (Shel Lab, Oregon, USA), vyhřívaná vodní lázeň GFL 1012 (GFL, Burgwedel, Německo), scanner SureScan Dx Microarray Scanner (Agilent Technologies, Kalifornie, USA, stolní centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburk, Německo), Termoblok Dry Block Thermostat Bio TDB-100 (BioSan, Riga, Lotyšsko), mikropipety (Gilson, Middleton, WI, USA)

Spotřební materiál:

2ml plastové mikrokumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo), purifikační kolony (Agilent Technologies, Kalifornie, USA), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA, laboratorní sklo

Chemikálie a roztoky:

Hybridizační kit Agilent Microarray Hybridization Chamber Kit (Agilent Technologies, Kalifornie, USA), Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip WASH BUFFER 1 a 2 (Agilent Technologies, Kalifornie, USA), SureTaq DNA labeling Kit – Cyanine-5-dUTP, Cyanine-3-dUTP, male and female reference DNA, Exo(-) Klenow, 5x gDNA Reaction Buffer, 10x

dNTP MIX, Random Primers, Nuclease-Free voda, 10x Restriction Enzyme Buffer, BSA, *Alu* I Restriction Digest Enzyme, *Rsa* I Restriction Digest Enzyme (Agilent Technologies, Kalifornie, USA), Human Cot-1 DNA (Invitrogen, Waltham, MA, USA), Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kit – 2X -Hi-RPM-hybridization Buffer, 10x Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Blocking Agent (Agilent Technologies, Kalifornie, USA), 1x TE pufr

Příprava DNA

1. Dle koncentrace DNA byl vzorek zředěn beznukleazovou vodou (nuclease free) tak, aby ve výsledném objemu 20,2 μ l bylo 1000 ng DNA.
2. Byla připravena mužská a ženská kontrolní DNA dle počtu a pohlaví pacientů. Vždy smícháním 5 μ l kontrolní DNA (200 ng/ μ l) a 15,2 μ l vody.

Restrikční štěpení DNA

1. Byl připraven MIX 1 dle schématu v Tabulce 3.

Tabulka 3: Příprava MIXU 1 pro restrikční štěpení DNA

Složka	Množství [μ l]
H ₂ O	18
10x Restrikční pufr	23,4
BSA	1,8
<i>Alu</i>	4,5
<i>Rsa</i>	4,5

2. K připravené DNA bylo přidáno 5,8 μ l MIXU 1.
3. Zkumavky byly umístěny do cykleru s nastaveným programem Restriction Agilent dle schématu v Tabulce 4.

Tabulka 4: Nastavení cykleru

Teplota	Čas
37 °C	2 hodiny
65 °C	20 minut
4 °C	∞

Fluorescenční značení DNA

1. Ke vzorkům bylo přidáno 5 μ l Random Primers a následně byly zkumavky vloženy do termobloku vyhřátého na 98 °C na 3 minuty.
2. Vzorky byly ochlazeny na ledu po dobu 5 minut.
3. Byly připraveny 2 zkumavky MIXU 2 dle schématu v tabulce 5. Do jedné zkumavky byly přidány Cyanine 3 – dUTP (Cy3), do druhé Cyanine 5 – dUTP (Cy5).

Tabulka 5: Příprava MIXU 2 pro fluorescenční značení DNA

Složka	Množství [μ l]
5x gDNA restrikční pufr	42,5
10x dNTP	21,25
Cy3/Cy5 dUTP	12,75
Exo Klenow	4,25

4. Do každé zkumavky byl přidán MIX 2 v množství 19 μ l. K DNA pacientů byl přidán MIX 2 obsahující barvu Cy5 a ke kontrolní DNA Cy3.
5. Zkumavky byly umístěny do cykleru s nastaveným programem dle schématu v Tabulce 6.

Tabulka 6: Nastavení cykleru pro fluorescenční značení DNA

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

Purifikace značené DNA

1. K DNA bylo přidáno 430 μ l TE pufru a celý obsah zkumavky byl přenesen do filtru a filtr umístěn do zkumavky (vše součástí SureTaq DNA labeling Kitu).
2. Zkumavky byly centrifugovány při 14 000 g, 10 minut.
3. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a do filtru bylo přidáno 480 μ l TE pufru.
4. Zkumavky byly centrifugovány při 14 000 g, 10 minut.

5. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a filtr byl otočen do nové zkumavky.
6. Zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při 1000 g.

Příprava sond na čip

1. Specifická aktivita získané DNA byla zjištěna pomocí měření na NanoDropu. Ze zjištěných hodnot byla vypočítána specifická aktivita dle vzorce $A = \frac{\text{koncentrace Cy3 (Cy5)} (\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}})}{\text{koncentrace DNA} (\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}})}$. Specifická aktivita pro vzorky značené Cy3 se pohybuje v rozmezí 25-40 a pro vzorky s Cy5 20-35. Na základě zjištěných specifických aktivit a pohlaví, byla přiřazena kontrolní DNA ke vzorku DNA pacienta.
2. DNA pacienta a kontrolní DNA byly smíchány a bylo přidáno 71 μl hybridizačního mixu, který byl nachystán dle schématu v Tabulce 7.

Tabulka 7: Příprava hybridizačního mixu

Složka	Množství [μl]
Cot 1	21,8
10 x Blokovací roztok	48
2x-Hi-RPM-Hybridizační pufr	240

3. Obsah zkumavek byl stočen a zkumavky byly vloženy na 3 minuty do termobloku (98 °C).
4. Zkumavky byly vloženy na 30 minut do vodní lázně vyhřáté na 37 °C.
5. Zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při 6000 g.

Nanesení vzorku na ČIP

K analýze byly používány čipy platformy 4x180K + SNP

1. 100 μl připravené sondy (směs kontrolní DNA a DNA pacienta) bylo naneseno na krycí sklo mikročipu, na sklo byl přiložen mikročip (kódem dolů).
2. Připravený mikročip byl v držáku umístěn do hybridizační pece.
3. Čipy byly inkubovány v otáčivém inkubátoru po dobu 24 hodin při 67 °C.

Odmytí čipu

1. Po inkubaci byl čip vyjmut z držáku a v misce naplněné pufrem č.1 oddělen od krycího skla.
2. Čip byl umístěn do stojánku a přenesen do nové misky s pufrem č.1 a ponechán v pufru 5 minut.
3. Stojánek s čipem byl přenesen do misky naplněné pufrem č.2 vytemperované na 37 °C inkubován 1,5 minuty.

Skenování čipu

1. Čip byl upevněn do držáku a umístěn do skeneru
2. Po naskenování byl obrázek čipu dále zpracováván a hodnocen pomocí programu Cytogenomics v5.0 (Agilent)

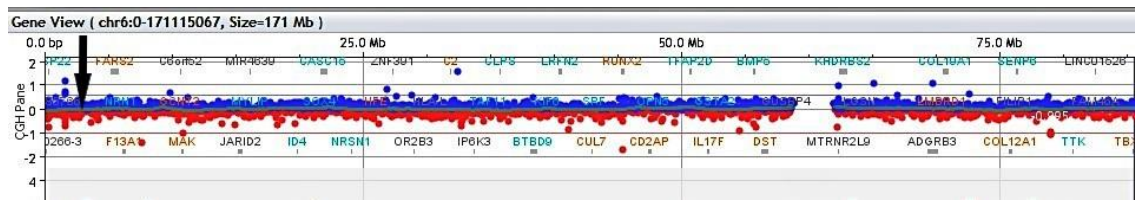
4.2. Analýza obrazu a hodnocení

Při samotné analýze obrazu skener snímá nejprve intenzitu každé barvy (fluorochromu) zvlášť a poté dojde k jejich překrytí. Obecně platí, že pokud není v genomu pacient žádná změna, je poměr intenzit obou fluorochromů roven hodnotě 1. Pokud došlo ke zmnožení úseku, na čipu bude převládat intenzita fluorochromu navázaného na DNA pacienta a poměr bude větší než 1. Pokud došlo ke ztrátě úseku, bude převládat fluorochrom navázaný na kontrolní DNA a poměr bude menší než 1.

Tímto způsobem je hodnocen každý spot na čipu (každý spot představuje určitou pozici v genomu). Minimální hodnota poměru intenzit fluorochromů, kterou přístroj eviduje jako zmnožení je 0,58, pro delecii pak -1. Poměr intenzit (Cy3 a Cy5) je pro lepší hodnocení logaritmován. Hodnota Log2 (vzorek/kontrola) se v případě zmnožení pohybuje v kladných hodnotách, při delecii v hodnotách záporných a v situacích, když nedošlo k žádným změnám, osciluje hodnota Log2 kolem 0. Analýza je tak založena na nalezení hodnot Log2, které se významně odchyľují od hodnoty 0. Program pro analýzu a vyhodnocení obrazu normalizuje výsledky na diploidní genom.

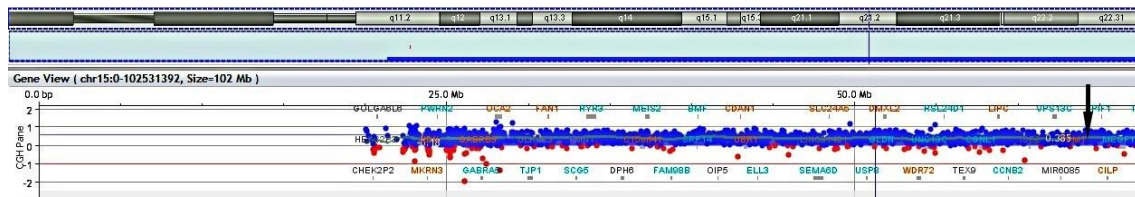
Příklady výstupů z programu Agilent Cytogenomics při hodnocení výsledků jsou zobrazeny na Obrázcích 5, 6 a 7.

Obrázek 5: Normální nález chromozomu 6



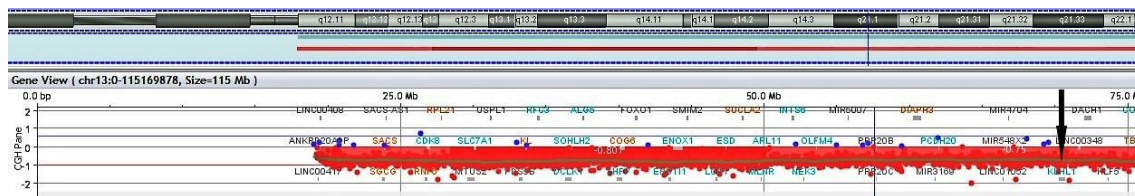
Legenda: Zelená čára (označená šipkou) osciluje okolo hodnoty $\text{Log}_2 = 0$. Intenzita detekovaných fluorochromů je v rovnováze, což signalizuje, že na chromozomu nedošlo k žádné delecii ani zmnožení

Obrázek 6: Zmnožení chromozomu 15



Legenda: Zelená čára osciluje okolo hodnoty $\text{Log}_2 = 0,58$. Intenzita detekovaných fluorochromů není v rovnováze. Fluorochrom Cy3 je v nadbytku což signalizuje, že na chromozomu došlo ke zmnožení jeho části.

Obrázek 7: Delece (monozomie) chromozomu 13

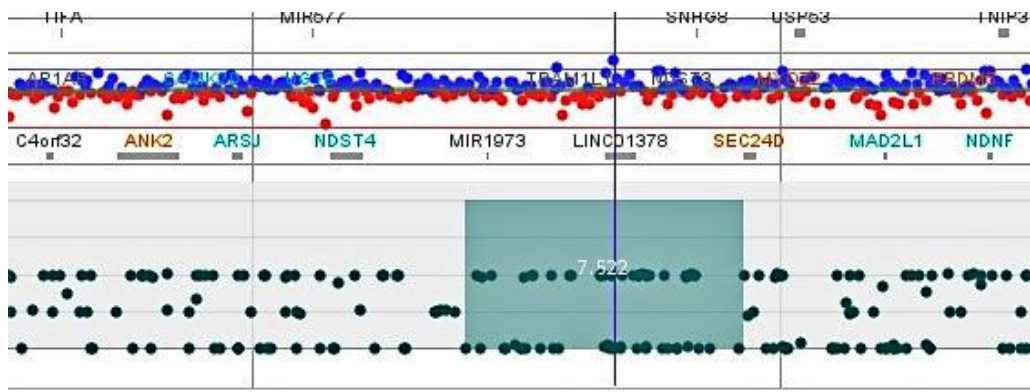


Legenda: Zelená čára osciluje okolo hodnoty $\text{Log}_2 = -1$. Intenzita detekovaných fluorochromů není v rovnováze. Fluorochrom Cy5 je v nadbytku což signalizuje, že na chromozomu došlo k delecii jeho části.

Při analýze byla z hodnocení vyloučena oblast kódující gen *IGH*, jelikož aCGH nedokáže detekovat balancované translokace, které se genu *IGH* často týkají. Dále bylo třeba zohledňovat, že v oblastech okolo centromer a na koncích chromozomů (včetně genu *IGH*) dochází k nepřesným detekcím změn v důsledku problémového nasedání sond.

Analýza byla prováděna pomocí čipu Agilent 4X180K SNP, který umožňuje i detekci SNP a tím detekci CNN-LOH. Systém tedy používá jak sondy pro detekci delecí a zmnožení, tak i speciální sondy pro detekci SNP. Jako oblast s CNN-LOH byl považován úsek s absencí alelické konstituce AB o velikosti alespoň 3 Mb. Příklad výstupu z programu Agilent Cytogenomic při nálezu CNN-LOH je zobrazen na Obrázku 9.

Obrázek 9: Ztráta heterozygosity postihující krátký úsek chromozomu 4



Legenda: Tmavě modře zbarvená oblast ohraničuje úsek s dlouhodobou nepřítomností alely od druhého z rodičů, což signalizuje přítomnost CNN-LOH v daném úseku chromozomu

5. Výsledky

Vyšetřovaný soubor tvořilo 51 pacientů s MM, kteří byli vyšetřeni v letech 2017-2018 v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL. V premaligním stádiu MGUS byli 2 pacienti, ve stádiu SMM 4 pacienti a 45 pacientů mělo aktivní MM. Medián věku byl 71 let (rozsah 48-89 let). Imunologický typ paraproteinu byl nejčastěji IgG (28 pacientů), dále IgA (15 pacientů), BJ (6 pacientů) a IgD (2 pacienti). U 26 pacientů byl zjištěn typ lehkého řetězce kappa a u 25 pacientů pak řetězec lambda. Základní charakteristika souboru je shrnuta v Tabulce 8.

Tabulka 8: Charakteristika analyzovaného souboru pacientů

Charakteristika souboru pacientů		Početní zastoupení
Pohlaví	Muži	19
	Ženy	32
Imunologický subtyp	IgG	28
	IgA	15
	BJ	6
	IgD	2
Typ lehkého řetězce	Kappa	26
	Lambda	25
Stádium onemocnění	MGUS	2
	SMM	4
	MM	45

Vzorky pacientů byly analyzovány pomocí metody aCGH a následně byly výsledky porovnávány s výsledky získanými metodou FICTION. Výsledky metody FICTION jsem převzala z Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL.

Vyšetřovaná DNA byla získána z buněk KD fixovaných pro cytogenetickou analýzu (9 pacientů) nebo z CD138+ buněk separovaných metodou MACS (42 pacientů). U každého vzorku KD, který byl použit pro separaci metodou MACS bylo změřeno zastoupení plazmatických buněk v Laboratoři krevních obrazů cytomorfolgie a v Laboratoři průtokové

cytometrie HOK FNOL. Medián zastoupení PB v KD byl 18 % a pohyboval se v rozmezí od 0,9 % do 90 %. Medián čistoty separované populace buněk byla stanoven na hodnotu 81 % (28-98,6).

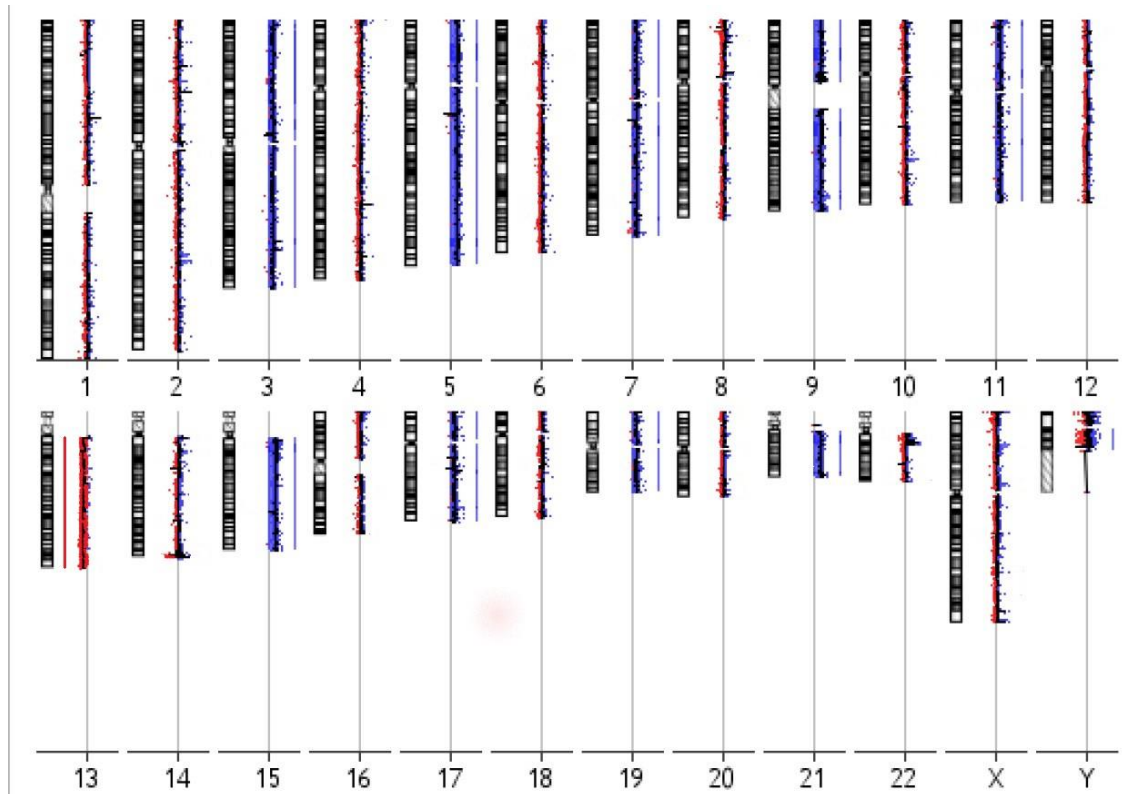
Podrobný zápis výsledků arrayCGH jednotlivých pacientů podle mezinárodního systému pro cytogenetickou nomenklaturu (ISCN) z roku 2016 je uveden v Příloze 1.

Chromozomové změny byly nalezeny u 50/51 (98 %) pacientů. U 1 pacienta nebyly detekovány žádné změny. Klasickému rozdělení na základě přítomnosti trizomií lichých chromozomů a translokací/monozomií (do skupin NH-MM a H-MM) odpovídalo všech 50 pacientů, u kterých byly detekovány chromozomové změny. Tyto změny jsou rozepsány v dalších kapitolách.

5.1. Změny v celkovém souboru pacientů

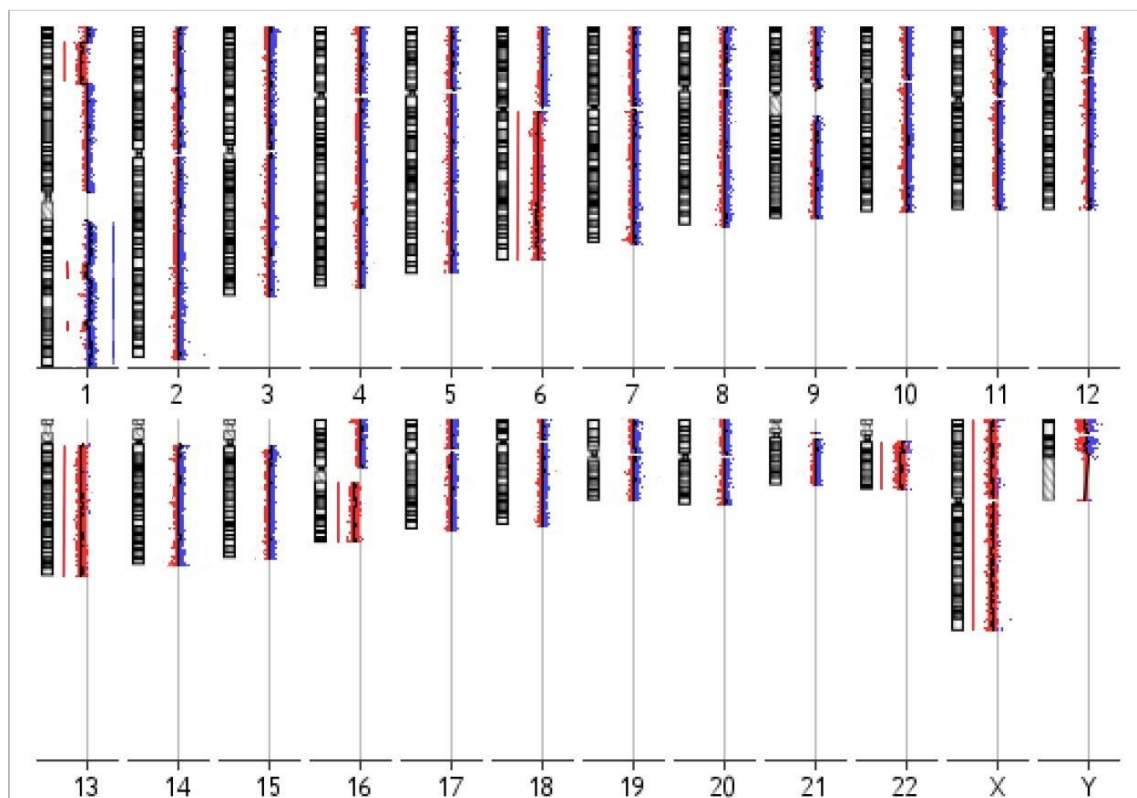
Při analýze změn v celém souboru 51 pacientů jsem se zaměřila na nejčastěji se vyskytující změny u pacientů s MM. Jednalo se o změny počtu chromozomů, delece a zmožení částí chromozomů. Všechny abnormality byly detekovány metodou aCGH, a následně ověřeny metodou FICTION s výjimkou změn a translokací genu *IGH*, které byly metodou FICTION doplněny. Příklady kompletních aCGH profilů pro H-MM a NH-MM z analyzovaného souboru pacientů (pořízené v programu Agilent Cytogenomics) jsou zobrazeny na Obrázcích 10 a 11.

Obrázek 10: Výstup z programu Agilent Cytogenomics zobrazující celý genový profil pacienta s H-MM



Legenda: Trizomie chromozomu 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19, 21; monozomie chromozomu 13

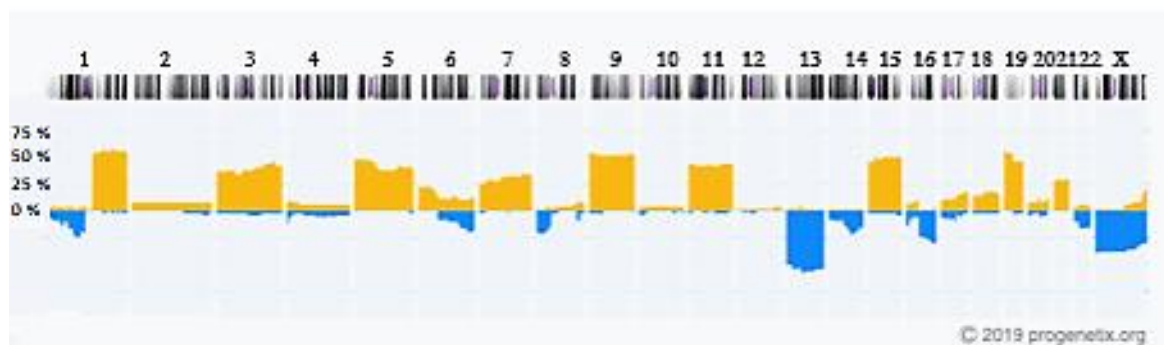
Obrázek 11: Výstup z programu Agilent Cytogenomics zobrazující celý genový profil pacienta s NH-MM



Legenda: Delece chromozomu 1, 6 a 16; monozomie chromozomu 13, 22 a X

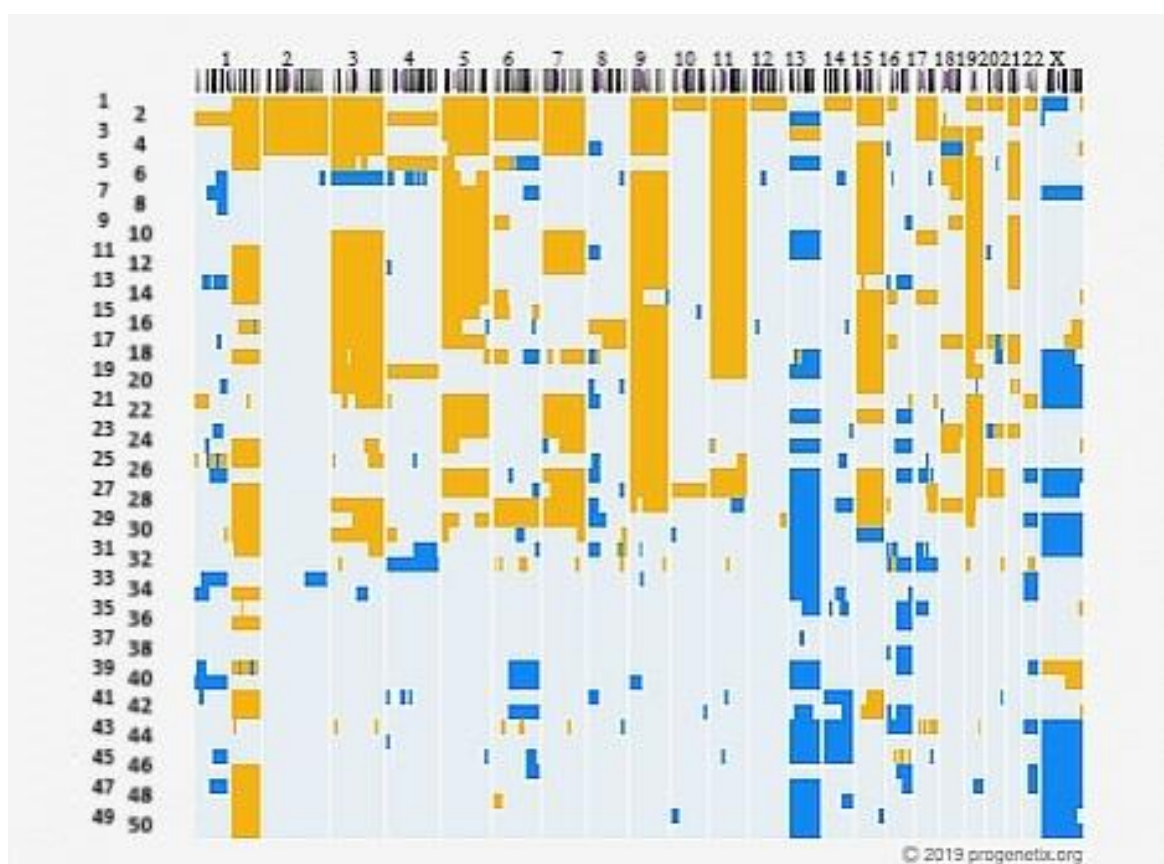
V programu Progenetix (www.progenetix.org) byly pro ilustraci pořízeny dva grafické výstupy. Graf 1 zobrazuje změny u celého souboru pacientů s výjimkou 1 pacienta, u kterého nebyla detekovaná žádná změna. Graf 2 pak zobrazuje změny u jednotlivých pacientů.

Graf 1: Souhrnný graf zobrazující chromozomové změny v celém souboru 50 pacientů s MM



Legenda: V horním řádku jsou zobrazeny chromozomy, v levé části pak % zastoupení změn v konkrétní chromozomové oblasti. Žluté oblasti signalizují zmožnění dané části a modré ztráty určitých úseků chromozomů.

Graf 2: Výskyt chromozomálních změn u jednotlivých pacientů



Legenda: V horním řádku jsou zobrazeny chromozomy, v levé části grafu jsou číselně označeni pacienti. Žluté oblasti signalizují zmožnění dané části a modré ztráty určitých úseků chromozomů.

Početní změny chromozomů byly nalezeny u 46 pacientů. Monozomie jednoho nebo více chromozomů byla nalezena u 32 pacientů (64 %). Nejčastěji chybějícím chromozomem byl chromozom 13 a to u 26 pacientů (52 %). Další detekovanou změnou byla monozomie chromozomu X, která byla nalezena u 16 pacientů (31 %). U 3 pacientů došlo ke ztrátě chromozomu Y. U jednoho z nich se jednalo o jedinou detekovanou chromozomovou změnu.

Trizomie alespoň jednoho z chromozomů byla zjištěna u 30 pacientů. Většinou se jednalo o zmnožení více chromozomů, které bylo v některých případech provázeno tetrazomiemi. Trizomie chromozomu 17 byla nalezena u 4 pacientů (8 %), trizomie 15 u 19 (37 %) a trizomie 11 u 22 (43 %) pacientů.

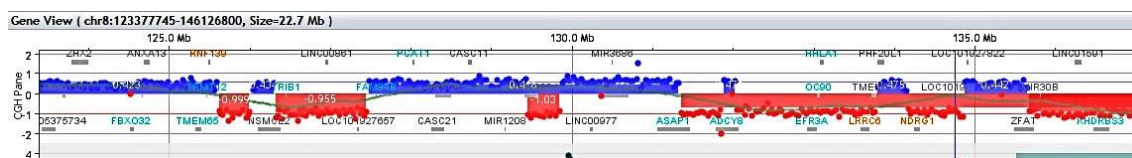
Delece 1p byla nalezena u 15 pacientů (30 %), zmnožení 1q bylo nalezeno u 29 pacientů (58 %) a v 5 případech doprovázelo delecí 1p. Zmnožení Xq bylo nalezeno u 8 pacientů (16%). Delece 6q byla nalezena u 10 pacientů (20 %), delece 13q u 5 pacientů (10 %), pouze ve 2 případech tato delece nezahrnovala gen *RBI*. Delece 16q byla nalezena u 16 pacientů (31 %), Delece 17p byla nalezena u 3 pacientů (6 %) a ani v jenom případě nezahrnovala gen *TP53*. Výsledky z analýzy chromozomových změn v souboru pacientů jsou shrnuty v Tabulce 9.

Tabulka 9: Chromozomové změny v souboru pacientů

Analyzovaná změna	Počet pacientů
Zmnožení celých lichých chromozomů	30
Monozomie 13/delece 13q	26/5
Zmnožení 1q	29
Zmnožení celých sudých chromozomů	15
Monozomie X	16
Zmnožení Xq	8
Delece 16q	14
Delece 6q	10
Delece 1p	15
Ztráta chromozomu Y	3
Delece 17p	3

U 2 pacientů byla detekována chromotripse. V prvním případě postihla chromozom 8 u pacienta s H-MM (viz Obrázek 10). V druhém případě postihla chromozom 20 u pacienta s NH-MM.

Obrázek 12: Chromotripse na chromozomu 8 detekovaná u jednoho z pacientů



Neutrální ztráta heterozygosity (CNN-LOH) byla detekována celkem u 13 pacientů (26 %). Velikosti úseku s CNN-LOH se pohybovaly mezi 2,3 Mb a 146 Mb s mediánem 8,55 Mb. I přes počáteční stanovení hranice velikosti na 3 Mb byly u dvou pacientů zařazeny i oblasti o menší velikosti z důvodu jednoznačného určení daných úseků. Celkový počet detekovaných CNN-LOH byl 51 s mediánem 2 změny na pacienta. CNN-LOH byla nejčastěji detekována na chromozomu 5 (6x), 1 (5x) a na chromozomech 6, 7 a 2 (vždy 3x). U 5 pacientů se úsek s CNN-LOH vyskytl pouze 1. U jednoho pacienta byla detekována CNN-LOH zahrnující celý chromozom 2 a jednalo se o jedinou CNN-LOH v celém genomu.

5.2. Hyperdiploidní typ MM

Do skupiny nemocných s H-MM bylo zařazeno celkem 30 pacientů (60 %). Trizomie lichých chromozomů, které jsou pro skupinu H-MM typické, byly detekovány u všech pacientů. Nejčastěji postihovala trizomie chromozomy 9 (70 %), 11 (73 %) a 19 (70 %). U 15 pacientů (50 %) se vyskytly trizomie lichých chromozomů společně s trizomiemi sudých chromozomů. Nejčastěji se jednalo o chromozom 2, 6 a 18. U 9 pacientů (30 %) byly detekovány i tetrazomie, nejčastěji chromozomů 9 a 15. Trizomie chromozomu 1 se vyskytla pouze v 1 případě.

Trizomie lichých chromozomů byly často provázány delecemi 1p, které byly detekovány u 10 pacientů (33%). U 40 % (12/30) pacientů s H-MM byla prokázána monosomie chromozomu 13. Delece 13q byla nalezena pouze u 1 pacienta a zahrnovala gen *RBI*. Delece 17p byla nalezena u 1 pacienta ale nezahrnula gen *TP53*. Zmnožení 1q se vyskytlo u 16 pacientů (53 %). Oba pacienti s premaligním stadiem MGUS a 2 pacienti se SMM vykazovali genetický subtyp H-MM. U 1 pacienta se společně s trizomiemi vyskytla

i přestavba *IGH* genu, která není pro pacienty s H-MM typická. Translokační partner nebyl u této přestavby určen. Změna je popsána v kapitole zabývající se změnami *IGH* genu.

5.3. Nonhyperdiploidní typ MM

Do skupiny NH-MM bylo zařazeno celkem 20 pacientů (40 %). Pro typ NH-MM je typická přítomnost translokací zahrnující *IGH* gen (14q32). Přítomnost těchto translokací byla určena metodou FICTION. Jejich analýza a konkrétní typy jsou rozepsány v kapitole změn *IGH* genu níže, jelikož detekce translokací *IGH* metodou aCGH není možná. U 4 pacientů (20 %) ve skupině NH-MM nebyla *IGH* translokace detekována.

Nejčastěji se u těchto pacientů vyskytuje monozomie chromozomu 13, která byla prokázána u 70 % (14/20) pacientů. U 7 pacientů byla monozomie 13 doprovázena i monozomií jiného chromozomu, nejčastěji chromozomu 14. U jednoho pacienta byla detekována pouze ztráta chromozomu Y. Nejednalo se ale o jednu změnu, byla doprovázena zmnožením 1q a delecí 16q. Zmnožení 1q, bylo zjištěno u 13 pacientů (65 %). Delece 16q, která se objevila u 9 pacientů (45 %). Delece 17p byla detekována u 2 pacientů, ale ani v jednom případě nezahrnovala gen *TP53*. 2 pacienti s SMM vykazovali typ NH-MM.

5.4. Změny *IGH* genu

Pro detekci translokací byla použita metoda FICTION. Změny zahrnující gen *IGH* byly detekovány u 23 pacientů (46 %). Přestavby *IGH* genu byly zjištěny u 16 pacientů (32 %). Přestavba *IGH* genu bez dalších změn v tomto genu byla nalezena u 11 pacientů. U 4 pacientů se jednalo o t(4;14) u 7 pak o t(11;14). Přestavba *IGH* genu spojená s delecí druhé alely se vyskytla u dvou pacientů, z nichž jednomu byla detekována t(14;20). U druhého pacienta nebyl určen translokační partner z důvodu nedostatku biologického materiálu. Přestavba s duplikací 3' nebo 5' konce se vyskytla u dvou pacientů. U jednoho se jednalo o t(14;16) u druhého o t(11;14). Samostatná delece 3' konce byla nalezena u 1 pacienta. Fyziologická delece 5' konce byla nalezena u 4 pacientů. V jednom případě byla u pacienta detekována delece 3' konce *IGH* genu a dále pak variantní t(4;14). U jednoho pacienta byla detekována delece 1 kopie genu *IGH* a metodou aCGH byla potvrzena monozomie celého chromozomu 14.

U pacienta, který patřil do skupiny H-MM byla nalezena přestavba obou alel *IGH* genu. Konkrétně se jednalo o parciální bialelickou delecí 5'konce spojenou s přestavbou obou alel a parciální bialelickou delecí 5'konce spojenou s delecí 3'konce. Shrnutí změn v genu *IGH* jsou shrnuty v Tabulce 10.

Tabulka 10: Shrnutí změn postihující gen *IGH*

Typ změny	Počet pacientů
Přestavba <i>IGH</i>	11
Přestavba + delecí 1 alely	2
Přestavba + duplikace 3'/5' konce	2
Delecí 3'/5'konce, delecí 1 kopie	7
Jiné změny	1

5.5. Opakovaná vyšetření

U 4 pacientů bylo provedeno opakované vyšetření v progresi/relapsu onemocnění. Ve dvou případech bylo první vyšetření provedeno v roce 2015, u jednoho pacienta v roce 2016 a následně u všech pacientů v roce 2018. Jeden pacient byl vyšetřen v roce 2015 a následně dvakrát v roce 2018. U všech pacientů byly zaznamenány rozdíly v nálezů chromozomových aberací. Přehled změn u každého pacienta je uveden v Tabulkách 11-12. U všech pacientů byly prokázány další nové změny, přičemž původní změny byly zachovány.

U prvního pacienta došlo k rapidnímu nárůstu zmnožení určitých úseků chromozomů (celkem 8) a u jednoho chromozomu byla zjištěna trizomie (viz tabulka 11).

Tabulka 11: Chromozomové aberace detekované u pacienta č.4 v relapsu

Typ změny	První vyšetření	Druhé vyšetření
Zmnožení 1p a 1q	NE	ANO
Zmnožení 3p22	NE	ANO
Zmnožení 3q11	ANO	ANO
Zmnožení 4p	NE	ANO
Trizomie chr. 5 a 7	ANO	ANO
Delece 8p	NE	ANO
Trizomie 11 a 15	ANO	ANO
Zmnožení 16q a 17q	NE	ANO
Trizomie chr. 19	ANO	ANO
Trizomie chr. 22	NE	ANO
Monozomie chr. X	ANO	ANO

U druhého pacienta došlo ke zmnožení terminálního úseku chromozomu X (Xq28). U třetího pak přibyla delece na chromozomu 13, která zahrnovala gen *RBI*.

Poslední pacient byl vyšetřován celkem 3x. První vyšetření bylo provedeno již v roce 2015, kdy byly detekovány pouze 2 změny: delece 16q a zmnožení X. Při dalších dvou vyšetřeních byl zjištěn rapidní nárůst aberací (celkem 8), ve většině případů se jednalo o delece na různých chromozomech. Při posledních dvou vyšetřeních byly nalezeny shodné aberace (viz Tabulka 12).

Tabulka 12: Chromozomové aberace detekované u pacienta č. 48 v relapsu

Typ změny	První vyšetření	Druhé vyšetření	Třetí vyšetření
Zmnožení 1q	NE	ANO	ANO
Delece 13q	NE	ANO	ANO
Zmnožení 14q	NE	ANO	ANO
Delece 16q	ANO	ANO	ANO
Delece 17q	NE	ANO	ANO
Zmnožení X	ANO	ANO	ANO

5.6. Vyšetření buněk z periferní krve

U 4 pacientů bylo vyšetření provedeno i na vzorcích z periferní krve (PK) z důvodu přítomnosti cirkulujících PB. Pouze u jednoho pacienta byly nalezeny rozdíly v cytogenetických změnách v buňkách KD a v cirkulujících PB. Ve vzorku KD byla nalezena delece 6q, která ve vzorku PB nebyla detekována. U tohoto pacienta bylo dále prokázáno rozdílné zastoupení jednotlivých změn (delece 16q, zmnožení 1q, X) v KD a PK. Přesné zastoupení jednotlivých změn bylo ověřeno metodou FICTION se specifickými sondami pro 1q21 a 6q21.

Jeden pacient byl vyšetřen ze vzorku KD a následně v progresi vyšetřen pouze z PK (velmi pokročilé stádium, v PK se vyskytovalo 90 % PB). Tento příklad je zde uveden pro znázornění kumulace genetických změn v průběhu onemocnění. Genetické změny nalezené v PB PK byly stejné jako v předchozím odběru KD a dále byly prokázány další nové změny související s progresí MM. Tyto změny jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Porovnání chromozomových změn v PB ve vzorku KD u jednoho pacienta.

Typ změny	Vyšetření KD	Vyšetření PK (v pozdním stádiu onemocnění)
zmnožení 3q	NE	ANO
Zmnožení 6p24	NE	ANO
Zmnožení 8q	NE	ANO
Delece 17p	NE	ANO
Delece 17q	NE	ANO
Monozomie chromozomu 17	ANO	NE
Vícečetná zmnožení na 22q	NE	ANO

5.7. Analýza metodou FICTION

S použitím metody FICTION byly analyzovány aberace, které se týkají konkrétních lokusů na chromozomech. Jednalo se primárně o abnormality oblasti 1q21, 1p32 a genu *RBI*. Analýza byla prováděna i na přítomnost delece genu *TP53*, která se však u žádného z pacientů nevyskytla.

Ztráta lokusu 1p32 byla detekována u 5 pacientů (2x H-MM, 3x NH-MM). Zmnožení lokusu 1q21 bylo nalezeno ve 25 případech (14x H-MM, 11x NH-MM). Jednalo se převážně o jeho duplikace a triplikace, v jednom případě o výskyt 4-5 kopií, kdy mluvíme o amplifikaci. Delece genu *RBI* byla detekována u 24 pacientů (47 %). Ve 21 případech se pak jednalo o ztrátu genu v důsledku ztráty celého chromozomu 13.

U pacientů v relapsu a progresi byl základní panel vyšetření doplněn o vyšetření abnormalit genu *MYC*.

Stručné shrnutí abnormalit lokusů 1q21, 1p32, genu *RBI* a genu *MYC* je shrnuto v Tabulce v Příloze 2.

6. Diskuze

Mnohočetný myelom je maligní onemocnění charakterizované nekontrolovaným množením klonálních plazmatických buněk v KD, které způsobují řadu komplikací vedoucích k orgánovému poškození. MM je onemocnění charakteristické výskytem heterogenních chromozomových aberací a mutací v mnoha genech. (Fairfield *et al.*, 2016).

Detekce takových chromozomových abnormalit patří v dnešní době k nejdůležitějším prognostickým markerům. Zatímco tradiční techniky karyotypizace dokáží odhalit abnormality v necelých 30 % případech, nové techniky jako i-FISH a aCGH zachytí změny až u 90 % pacientů (Smetana *et al.*, 2014b).

Pro analýzu pomocí aCGH je jedním z hlavních limitujících faktorů zastoupení maligních plazmatických buněk. Pro detekci chromozomových změn je nutné jejich více než 20% zastoupení (Rack *et al.*, 2016). K vyššímu zachytu aberací metodami aCGH a FISH dochází při užití CD138+ separace (MACS, FACS), která selektuje PB a usnadňuje tím detekci chromozomálních změn i u vzorků s jejich velmi malým zastoupením (Čumová *et al.*, 2010). Další možností analýzy jen PB je metoda FICTION. V diplomové práci byla použita metoda FICTION a separace PB metodou MACS.

Vyšetřovaný soubor tvořilo celkem 51 pacientů. Chromozomové změny jsem pomocí metody aCGH detekovala u 50 pacientů (98 %). Výskyt chromozomových změn se shoduje s výsledky publikovanými mnoha autory včetně Rack *et al.* (2016) a Kjeldsen (2016). Pacienti s MM se dají tradičně rozdělit do dvou hlavních skupin, a to hyperdiploidní a nonhyperdiploidní. V souboru bylo celkem 30 pacientů (60 %) s typem H-MM a 20 (40 %) s NH-MM. Gupta *et al.* (2017) uvádí výskyt hyperdiploidního typu v 47 % a nonhyperdiploidního typu v 53 %. Obdobné výsledky publikoval i Smetana *et al.* (2014b). Z výsledků těchto autorů se zdá být výskyt obou typů rovnoměrný. Mírně vyšší výskyt H-MM může být ovlivněn velikostí vyšetřovaného souboru.

V souboru hyperdiploidních pacientů je typický výskyt trizomií lichých chromozomů. Nejčastěji zmnouženým chromozomem byl chromozom 11 (73 %), 9 (70 %) a 19 (70 %). Smetana *et al.* (2014b) uvádí jako nejčastější trizomie chromozomů 9 a 15 s výskytem 38 %. Stejně výsledky uvidí i Smetana *et al.* (2014a), kteří detekovali jako nejčastější trizomie právě 9 a 15 a to v 50 %. V mém souboru se trizomie chromozomu 15 vyskytovala v 30 % případech.

Monozomie alespoň jednoho chromozomu byla prokázána u 32 pacientů (64 %), nejčastěji postihovala chromozom X (31 %) a chromozom 13 (52 %). Kjeldsen (2016) zaznamenal nejčastější výskyt monozomie chromozomů 13 (43 %) a X (26 %). Smetana *et al.* (2014a) uvádějí výskyt monozomie 13 u 25 % pacientů a monozomii X u 38 % pacientů. Smetana *et al.* (2014b) uvádí výskyt monozomie 13 ve velmi vysokém procentu a to v 51 % případů. Scitta *et al.* (2016) také uvádí chromozomy 13 a X jako nejčastěji zasažené monozomií a uvádí i chromozom 22, u kterého se v mém souboru monozomie vyskytovala v menším míře.

Gutiérrez *et al.* (2004) uvádí, že oblasti nejčastěji postihnuté delecí jsou 13q (39 %), 16q (18 %), 6q (10 %) a 8p (10 %). Dále uvádí, že všichni pacienti s delecí 13q vykazovali delecí genu *RBI*. Smetana *et al.* (2014a) také uvádí jako nejčastější oblast s delecí 13q (43 %). V mém souboru byla nejčastější delecí delece 1p a to u 15 pacientů (30 %). Delecí 16q jsem zaznamenala u 16 pacientů (31 %), 6q u 10 pacientů (20 %). Delecí 13q jsem detekovala pouze u 5 pacientů (10 %) a ve 3 případech zahrnovala gen *RBI*. Smetana *et al.* (2014b) uvádí obdobný výskyt delece na 16q (25 %). Dále uvádí výskyt delece na 17q ve 14 % případů. V mém souboru byl výskyt lehce nižší, delecí na 17p jsem identifikovala u 3 pacientů (6 %) a nezahrnovala gen *TP53*. Dále Smetana uvádí zmnožení 1q v 71 %, delecí 1p ve 46 % případů. Gutiérrez *et al.* (2004) uvádí výskyt zmnožení 1q u 45 % pacientů a jedná se o oblast nejčastěji zmnoženou. Oblast 1q byla nejčastěji zmnožená (50 %) i v souboru pacientů Smetana *et al.* (2014a). Tato oblast byla nejvíce zmnožená i v mém souboru (58 %).

Analýza změn zahrnující gen *IGH* byla provedena metodou FICTION, protože tyto změny jsou metodou aCGH nedetekovatelné. Je to způsobeno minimálními ztrátami genetického materiálu, ke kterým dochází při balancovaných translokacích (případně inverzích) a VDJ rekombinacích. Takové ztráty o zanedbatelném rozsahu metoda aCGH nedokáže rozpoznat. Změny *IGH* genu byly detekovány u 23 (47 %) pacientů. U 16 pacientů (32 %) byla detekována translokace *IGH* genu. Zbytek změn představovaly delece 3' nebo 5' konce *IGH* genu, případně delece celé jedné alely. Nejčastější translokace byly t(11;14) (8 pacientů) a t(4;14) (5 pacientů). Kjeldsen (2016) uvádí výskyt translokací v 52 % a také jako nejčastější uvádí translokace t(11;14) a t(4;14). Rack *et al.* (2016) zaznamenal podobný výskyt *IGH* translokací (34 %). Jako nejčastější translokaci uvádí t(11;14), dále t(4;14) a t(14;16). V mém souboru se translokace t(14;16) prokázala pouze v jednom případě. Dále byla v 1 případě prokázána i t(14;20).

Chromotripse představuje mnohonásobnou fragmentaci ramene nebo celého chromozomu, přeskupení vzniklých úseků a jejich následné spojení. Jedná se o chromozomovou katastrofu, která je spojená s krátkým přežíváním. Chromotripse je považována za vysoce rizikový faktor u nemocných s MM a její výskyt nepřesahuje 1 %. V mém souboru pacientů se vyskytla ve 2 případech. V jednom případě se jednalo o chromozom 8 a v druhém o chromozom 20. Berry *et al.* (2017) detekoval tuto aberaci ve 2 případech (3 %). Chromotripse zasahovala chromozom 1 a 16. Chromotripse se vyskytla jak u pacienta s H-MM, tak s NH-MM.

Pomocí SNP analýzy byla analyzována i přítomnost CNN-LOH u všech chromozomů. Celkem byla CNN-LOH prokázána u 13 pacientů (26 %). Tento výsledek se shoduje s výsledky publikovanými López-Corral *et al.* (2012) a Walker *et al.* (2010), kteří uvádí výskyt u 38 % a 37 % pacientů. López-Corral *et al.* (2012) zaznamenal celkem 65 CNN-LOH s mediánem velikosti 33 MB. V mém souboru byl medián nižší a to 8,55 MB, počet změn však dosahoval podobné hodnoty (51). Medián počtu 2 změn na pacienta se shodoval jak s výsledky López-Corral *et al.* (2012), tak s Walker *et al.* (2006), kteří uvádějí 2, respektive 3 CNN-LOH na pacienta. V mém případě byla CNN-LOH nejčastěji detekována na chromozomu 5, 1 a dále na chromozomech 6, 7 a 2. Walker *et al.* (2010) uvádí naopak nejčastější výskyt na chromozomu X a dále na chromozomech 16 a 1. U 5 (38 %) pacientů se vyskytl pouze 1 CNN-LOH v celém genomu. Obdobný výsledek uvádí i López-Corral *et al.* (2012). V mém souboru jsem detekovala pouze v jednom případě CNN-LOH celého chromozomu a jednalo se o chromozom 2. Toto zjištění se shoduje s výsledkem publikovaným Walker *et al.* (2006), López-Corral *et al.* (2012) za to detekoval 7 chromozomů s celochromozomovou CNN-LOH. Kim *et al.* (2014) naopak nedetekoval žádný CNN-LOH postihující celý chromozom.

Při opakovaných vyšetřeních 4 pacientů byl ve všech případech zaznamenán nárůst chromozomových aberací. Prvotní vyšetření bylo provedeno v době diagnózy, opakovaná vyšetření v relapsu nebo progresi onemocnění. Zatímco u dvou případů se jednalo pouze o nepatrný nárůst aberací (1 změna), u dalších dvou pacientů byl markantní nárůst změn na různých chromozomech. Nárůst chromozomových změn se shoduje s údaji v literatuře, která uvádí kumulaci aberací jako známku nestability genomu a progresi onemocnění (López-Corral *et al.*, 2012)

Ve vzácných případech MM jsou nalezeny patologické PB i v PK. Jedná se o agresivní formu nebo pokročilé stádium MM, kdy PB ztrácí závislost na mikroprostředí KD. Přítomnost PB v PK je spojená se značným rizikem progresu a celkově nižším přežíváním pacientů. Dále koreluje s vyšším stádiem onemocnění a odpovědí na zvolenou léčbu (Bezděková *et al.*, 2017). Při porovnání výsledků získaných z vyšetření buněk KD a z cirkulujících buněk v PK ve stejném časovém období byl detekován rozdíl v nálezů změn pouze u 1 pacienta ze 4. V buňkách KD byla detekována delece 6q, která se v buňkách PK nevyskytovala. U dalšího pacienta byla vyšetřena KD i PK, ale v časovém odstupu. Analýza PK byla provedena ve vysoce pokročilém stádiu onemocnění, při 90% výskytu PB v krvi. V PK byl detekován rapidní nárůst změn, byly detekovány jak změny původně nalezené v KD, tak i nové změny jako důsledek rapidní progresu onemocnění. U tohoto pacienta byla metodou FICTION v PK nalezena i přestavba genu *MYC* spojená s duplikací 5' konce genu, která je v literatuře uváděna jako změna spojená s progresí onemocnění (Prideaux *et al.*, 2014).

Celý soubor pacientů byl analyzován na přítomnost chromozomálních aberací metodou aCGH. Získané výsledky jsem porovnávala s daty získanými metodou FICTION. Většina výsledků vykazovala shodu. Největší odlišnost jsem zaznamenala u početních změn chromozomů. Odlišnost byla nalezena v případě trizomie chromozomu 15, kde aCGH odhalila trizomii u 2 dalších pacientů oproti FICTION. Tato odlišnost je způsobena skutečností, že analýza pomocí FISH využívá sondy specifické pro centromerickou část chromozomu, zatímco aCGH analyzuje celé chromozomy, ale centromerické oblasti jsou vyloučeny. Pokud je na chromozomu zmnoženo vše kromě centromery (př. nebalancovaná translokace akrocentrických chromozomů), metoda FISH nedetekuje trizomii. U dalších 3 pacientů metoda FICTION odhalila trizomie a tetrazomie chromozomu 15, ačkoliv u aCGH vyšla čistá tetrazomie. Tato odlišnost byla způsobena přítomností malého subklonu buněk s trizomiemi.

V 7 případech metoda FICTION odhalila trizomie chromozomu 15 či 17, ale metodou aCGH nebyl výsledek potvrzen. Tato odlišnost je způsobena malým subklonem buněk s abnormálním počtem chromozomů. Obdobný výsledek byl detekován u monozomie chromozomu 17 u dvou pacientů v případě FICTION, ale nikoliv u aCGH.

Abnormality genu *MYC* (8q24) jsou spojeny s progresí MM a jsou považovány za nepříznivý prognostický faktor. Metodou aCGH byla nalezena delece 5' konce genu *MYC* u jednoho pacienta, u dalšího pak duplikace celého genu. Obě tyto změny byly detekovány

i metodou FICTION. U dalších 6 pacientů byla pomocí FICTION detekována i přestavba tohoto genu, která se nedá detekovat metodou aCGH, protože nedochází ke ztrátám nebo zmnožení genetického materiálu. U jednoho z pacientů metoda FICTION odhalila ve 23 % PB zmnožení celého genu MYC, které nebylo metodou aCGH potvrzeno pravděpodobně v důsledku malého zastoupení buněk s touto změnou. U toho pacienta bylo vyšetření metodou aCGH provedeno na buňkách fixované KD, nikoli z CD138+ separovaných buněk, kde by byla větší pravděpodobnost odhalení změny v menším klonu. V souboru se tedy nacházelo 9 pacientů (18 %) se změnou zahrnující gen *MYC*. Smetana *et al.* (2014b) uvádí výskyt aberací zasahující gen *MYC* v 32 % zahrnující jak delece, zmnožení i translokace.

Vysoké procento detekovaných změn díky kombinaci metod FICTION a aCGH umožňuje spolehlivě analyzovat chromozomální aberace u nemocných s MM. Na základě výsledků analýz genetických změn bylo zjištěno, že MM je vysoce heterogenní onemocnění. I přesto je možné pacienty rozdělit do několika prognostických skupin. Nalezené chromozomové aberace mohou následně ovlivnit i volbu léčby, která se v dnešní době značně zdokonalila. Mezi často používaná léčiva patří v současné době hlavně imunomodulační léčiva (IMiDs) jako lenalidomid, dále proteázomové inhibitory jako bortezomib, monoklonální protilátky jako daratumumab a inhibitory histon deacetyláz (panobinostat) (Dingli *et al.*, 2017).

7. Závěr

Cílem teoretické části diplomové práce bylo shrnutí obecných informací o monoklonálních gamapatiích se zaměřením na MM. Byly popsány jeho příznaky, kritéria pro určení diagnózy a stádia, přítomnost cytogenetických změn, metody jejich detekce a krátce také možnosti léčby.

Cílem praktické části bylo analyzovat metodou aCGH soubor 51 pacientů s diagnózou MM, případně MGUS a SMM a zjistit přítomnost cytogenetických změn. Zjištěné změny byly doplněny o výsledky z analýzy metodou FICTION a to hlavně z důvodu doplnění *IGH* translokací. Chromozomové aberace byly detekovány u 50 pacientů. Nejčastěji detekovanou změnou bylo zmnožení celých chromozomů (30 pacientů), následované zmnožením oblasti chromozomu 1q (29 pacientů) a ztrátami celých chromozomů (32 pacientů). Pacienti byly dále rozděleni do skupiny s H-MM (30 pacientů), NH-MM (20 pacientů) a pacienti bez zařazení. U každé skupiny byly podrobně analyzovány jednotlivé změny.

Diplomová práce prokázala význam metody aCGH v detekci chromozomových abnormalit, zejména v kombinaci s metodou FICTION. Spojení obou metod umožňuje vysoký záchyt jak *IGH* translokací, tak početních změn chromozomů a tím přesnější rozdělení pacientů s MM do prognostických skupin.

8. Seznam zdrojů

ADAM, Z., HÁJEK, R., MAYER, J., ŠČUDLA, V., VORLÍČEK, J. A KOL (1999): Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Brno: MU, ISBN 80-210-2034-2.

Adam, Z., MAISNAR, V., a kol. (2009): Mnohočetný myelom, jak včas rozpoznat tuto nemoc a jak s ní žít. Informace pro nemocné a jejich blízké. 3. přepracované a doplněné vydání. Brno: MU, ISBN 978-80-210-4680-1.

ADAM, Z., VORLÍČEK, J. A KOL. (2001): Hematologie 2, přehled maligních hematologických onemocnění. Praha: Grada Publishing, spol. s r. o., ISBN 80-247-0116-2.

ANDĚL, M., GREGOR, P., HORÁK, J., KMENT, M., WIDIMSKÝ, P. (2001): Vnitřní lékařství, díl 3b. Hematologie, Praha: Galén, ISBN 8072620851.

ANDRULIS, M., LEHNERS, N., CAPPER, D., PENZEL, R., HEINING, CH., HUELLEIN, J., ZENZ, T., VON DEIMLING, A., SCHIRMACHER, P., HO, A.D., GOLDSCHMIDT, H., NEBEN, K., RAAB, M.S. (2013): Targeting the BRAF V600E Mutation in Multiple Myeloma. *Cancer discovery* 3, 862-869.

BAKER, K.R., RICE, L. (2012): The amyloidoses: clinical features, diagnosis and treatment. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 8,3-7.

BALCÁRKOVÁ, J., MLYNÁRČIKOVÁ, M., MIČKOVÁ, P., ŠČUDLA, V., PIKA, T., BAČOVSKÝ, J., MINAŘÍK, J., JAROŠOVÁ, H. (2016): Analýza variantních nálezů počtu signálů při určení translokace t(4;14)(p16.3;q32.3) metodou FICTION u nemocných s mnohočetným myelomem. *Transfuze a hematologie dnes* 22, 182-188.

BARILLÉ-NION, S., BARLOGIE, B., BATAILLE, R., BERGSAGEL, P.L., EPSTEIN, J., FENTON, R.G., JACOBSON, J., KUEHL, W.M., SHAUGHNESSY, J., TRICOT, G. (2003): Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *ASH Education Book January 2003*, 248-278.

BERRY, N.K., DIXON-MCLVER, A., SCOTT, R.J., ROWLINGS, P., ENJETI, A.K. (2017): Detection of complex genomic signatures associated with risk in plasma cell disorders. *Cancer Genetics* 218-219, 1-9.

BEZDĚKOVÁ, R., PENKA, M., HÁJEK, R., ŘÍKOVÁ, L. (2017): Cirkulující plazmocyty u monoklonálních gamapatií. *Klinická onkologie* 30, 29-34.

- BHAGAT, A.A., BOW, H., HOU, H.W., TAN, S.J., HAN, J., LIM, C.T. (2010): Microfluidics for cell separation. *Medical & Biological Engineering & Computing* 48, 999-1014.
- BOLLI, N., AVET-LOISEAU, H., WEDGE, D.C., VAN LOO, P., ALEXANDROV, L.B., MARTINCORENA, I., DAWSON, K.J., IORIO, F., NIK-ZAINAL, S., BIGNELL, G.R., HINTON, J.W., Li, Y., TUBIO, J.M.C., MCLAREN, S., O' MEARA, S., BUTLER, A.P., TEAGUE, J.W., MUDIE, L., ANDERSON, E., RASHID, N., TAI, Y.T., SHAMMAS, M.A., SPERLING, A.S., FULCINITI, M., RICHARDSON, P.G., PARMIGIANI, G., MAGRANGEAS, F., MINVIELLE, S., MOREAU, P., ATTAL, M., FACON, T., FUTREAL, A., ANDERSON, K.C., CAMPBELL, P.J., MUNSHI, N.C. (2014): Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications* 5, 2997.
- BUREŠOVÁ, I., KYJOVSKÁ, D., KOVÁŘOVÁ, L., MORAVCOVÁ, J., SUSKÁ, R., PERUTKA, T., ČUMOVÁ, J., HÁJEK, R. (2011): Algoritmus separace plazmatických buněk ze vzorků kostní dřeně. *Klinická onkologie* 24, 35-40.
- CORRE, J., MINSHI, N., AVET-LOISEAU, H. (2015): Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level? *Blood* 125, 1870-1876.
- ČUMOVÁ, J., KOVÁŘOVÁ, L., POTÁČOVÁ, A., BUREŠOVÁ, I., Kryukov, F., PENKA, M., MIČHÁLEK, J., HÁJEK, R. (2010): Optimization of immunomagnetic selection of myeloma cells from bone marrow using magnetic activated cell sorting. *International journal of hematology* 92, 314-319.
- DANKNER, M., ROSE, A.A.N., RAJKUMAR, S., SIEGEL, P.M., WATSON, I.R. (2018): Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene* 37, 3183–3199.
- DESJARDINS, P., CONKLIN, D. (2010): Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments* 45, 2565.
- DIB, A., GABREA, A., GLEBOV, O.K., BERGSAGEL, P.L., Kuehl, W.M. (2008): Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 25–31.
- DINGLI, D., AJLAWADHI, S., BERGSAGEL, P.L., BUADI, F.K., DISPENZIERI, A., FONSECA, R., GERTZ, M.A., GONSALVES, W.I., HAYMAN, S.R., KAPOOR, P.,

KOURELIS, T., KUMAR, S.K., KYLE, R.A., LACY, M.Q., LEUNG, N., LIN, Y., LUST, J.A., MIKHAEL, J.R., REEDER, C.B., ROY, V., RUSSELL, S.J., SHER, T., STEWART, A.K., WARSAME, R., ZELDENRUST, S.R., RAJKUMAR, S.V., KHAN, A.A.CH. (2017): Therapy for Relapsed Multiple Myeloma: Guidelines From the Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy. *Mayo Clinics Proceedings* 92, 578-598.

DRACH, J., ACKERMANN, J., FRITZ, E., KRÖMER, E., SCHUSTER, R., GISSLINGER H., DESANTIS, M., ZOJER, N., FIEGL, M., ROKA, S., SCHUSTER, J., HEINZ, R., LUDWIG, H., HUBER, H. (1998): Presence of a p53 Gene Deletion in Patients With Multiple Myeloma Predicts for Short Survival After Conventional-Dose Chemotherapy. *Blood* 92, 802-809.

FAIRFIELD, H., FALANK, C., AVERY, L., REAGAN, M.R. (2016): Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1364, 32-51.

FIŠEROVÁ, S., HÁJEK, R., DOUBEK, M., BULÍKOVÁ, A., BORKOVÁ, L., BANOVSÁ, A., VIDLÁKOVÁ, P., TŮZOVÁ, E., MAREŠCHOVÁ, E., VORLÍČEK, J., PENKA, M. (2001): Immunomagnetic separation of myeloma cells. *Klinická onkologie* 14, 46-50.

FONTANA, M.C., MARCONI, G., FEENSTRA, J.D.M., FONZI, E., PAPAYANNIDIS, C., DI RORÁ, A.G.L., PADELLA, A., SOLLI, V., FRANCHINI, E., OTTAVIANI, E., FERRARI, A., BALDAZZI, C., TESTONI, N., LACOBUCCI, I., SOVERINI, S., HAFERLACH, T., GUADAHNUOLO, V., SEMERAD, L., DOUBEK, M., STEURER, M., RACIL, Z., PAOLINI, S., MANFRINI, M., CAVO, M., SIMONETTI, G., KRALOVICS, R., MARTINELLI, G. (2018): Chromothripsis in acute myeloid leukemia: biological features and impact on survival. *Leukemia* 32, 1609-1620.

GARCÍA-ACERO, M., SUARÉZ-OBANDO, F., GÓMEZ-GUTIÉRREZ, A. (2018): CGH analysis in Colombian patients: findings of 1374 arrays in a seven-year study. *Molecular cytogenetics* [online] 11(1), [cit.2018-12-12] Dostupné z: <https://molecularycytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-018-0398-9>.

GOLE, L., LIN, A., CHUA, C., CHNG, W.J. (2014): Modified cIg-FISH protocol for multiple myeloma in routine cytogenetic laboratory practice. *Cancer genetics* 207, 31-34.

GRZASKO, N., HÁJEK, R., HUS, M., CHOCHOLSKA, S., MORAWKA, M., GIANNOPOULOS, K., DMOSZYNSKA, A. (2017): Chromosome 1 amplification has

similar prognostic value to del(17p13) and t(4;14)(p16;q32) in multiple myeloma patients: analysis of real-life data from the Polish Myeloma Study Group. *Leukemia & Lymphoma*, 58, 2089–2100.

GUNJAN, L.S., LANDAU, H., LONDONO, D., Devlin, S.M., KOSURI, S., LESOKHIN, A.M., LENDVAI, N., HASSOUN, H., CHUNG, D.J., KOEHNE, G., JHANWAR C.S., LANDGREN, O., LEVINE R., GIRALTB, S.A. (2017): Gain of chromosome 1q portends worse prognosis in multiple myeloma despite novel agent-based induction regimens and autologous transplantation. *Leukemia & Lymphoma* 58, 1823-1831.

GUPTA, R., MATHUR, N., RANI, L., DAHIYA, M., KUMAR, L., SHARMA, A. (2017): Dissecting Genetic Aberrations in Multiple Myeloma Using aCGH and MLPA. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 2017, e36.

GUTIÉRREZ, N.C., GARCÍA, L., HERNÁNDEZ, JESÚS M., LUMBRERAS, E., CASTELLANOS, M., RASILLO, A., MATEO, G., HERNÁNDEZ, JOSÉ M., PERÉZ, J., ORFAO, A., SAN MIGUEL, J.F. (2004): Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood* 104, 2661-2666.

HOREJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. (2002): *Základy imunologie*, 2 vydání. Praha: Triton, ISBN 80-7254-215-X.

HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. (2009): *Základy imunologie*, 4.vydání. Praha: Triton, ISBN 978-80-7387-280-9.

JELÍNEK, T., VŠIANSKÁ, P., HÁJEK, R. (2015): Monoklonální protilátky v léčbě mnohočetného myelomu. *Transfuze a hematologie dnes* 21, 74-83.

KAZANDJIAN, D. (2016): Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Seminars in oncology* 43, 676-681.

KEARNEY, L. (2006): Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenetic and Genome Research* 114, 189–198.

KIM, M., LEE, S.H., KIM, J., LEE, SE., KIM, YJ., MIN, CHK. (2014): Copy Number Variations Could Predict the Outcome of Bortezomib Plus Melphalan and Prednisone for Initial Treatment of Multiple Myeloma. *Genes Chromosomes and Cancer* 54, 20-27.

- KJELDSEN, E. (2016): Identification of prognostically relevant chromosomal abnormalities in Routine diagnostic of multiple myeloma using genomic profiling. *Cancer Genomics Proteomics* 13, 91-127.
- KLINCOVÁ, M., SANDECKÁ, V., MIKULÁŠOVÁ, A., RADOCHA, J., MAISNAR, V., HÁJEK, R. (2011): Monoklonální gamapatie nejasného významu: Úvod a současné klinické problémy. *Klinická onkologie* 24(Suppl), 14–17.
- KOČÁREK, E., PÁNEK M., NOVOTNÁ, D. (2010): *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-1880-7.*
- KORBEL, J.O., CAMPBELL, P.J. (2013): Criteria for Inference of Chromothripsis in Cancer Genomes. *Cell* 152, 1226-1236.
- KRAHULCOVÁ, E. A KOL. (1996): *Hematologie pro zdravotní sestry na transfúzních odděleních. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, ISBN 80-7013-214-0.*
- KUBICZKOVÁ, L., DÚCKA, M., SEDLAŘÍKOVÁ, L., FRYUKOV, F., HÁJEK, R., ŠEVČÍKOVÁ, S. (2013): Cykliny D v regulaci a dysregulaci buněčného cyklu u mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 26, 313-318.
- KUGLÍK, P., FILKOVÁ, H., OLTOVÁ, A., HÁJEK, R. (2006): Význam a současné možnosti diagnostiky cytogenetických změn u mnohočetného myelomu. *Vnitřní lékařství* 52, 76-78.
- KUGLÍK, P., VRÁNOVÁ, V., FILKOVÁ, H. (2008): Metody klasické a molekulární cytogenetiky v diagnostice mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 21, Supplementum 1, 198-203.
- KYLE, R.A., RAJKUMAR, S.V. (2009): Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 23, 3-9.
- LANDGREN, O., RAJKUMAR, S.V. (2016): New Developments in Diagnosis, Prognosis, and Assessment of Response in Multiple Myeloma. *Clinical cancer research* 22, 5428-5433.
- LENTZCH, S. (2013): *Genetics and molekular epidemiology of multiple myeloma. New York: Springer-Verlag, ISBN 978-1-4614-4660-6.*

LEUNG, E.WY., SIN, P.LF., WAN, T. TK. (2012): The Impact of FICTION on the Detection of Genetic Aberrations in Multiple Myeloma. *Journal of Hong Kong Institute of Medical Laboratory Sciences* 13.

LÓPEZ-CORRAL, L., SARASQUETE, M.E., BEÀ, S., GARCÍA-SANZ, R., MATEOS, M.V., CORCHETE, L.A., SAYAGUÉS, J.M., GARCÍA, E.M., BLADÉ, J., ORIOL, A., HERNÁNDEZ-GARCÍA, M.T., GIRALDO, P., HERNÁNDEZ, J., HONZÁLEZ, M., HERNÁNDEZ-RIVAS, J.M., SAN MIGUELL, J.F., GUTIÉRREZ, N.C. (2012): SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia* 26, 2521-2529.

MAGDELDIN, S. (2012): *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. Chorvatsko: Intech, ISBN 978-953-51-0458-2.

MACHÁLKOVÁ, K., MAISNAR, V. (2014): Rizikové faktory asymptomatického mnohočetného myelomu. *Klinická biochemie a metabolismus* 22, 70–73.

MAISNAR, V. (2013): Riziko přechodu monoklonální gamapatie nejasného významu do maligní monoklonální gamapatie. *Klinická biochemie a metabolismus* 21, 93–96.

MAISNAR, V. (2016): Nová diagnostická kritéria mnohočetného myelomu. *Klinická biochemie a metabolismus* 24, 127-128.

MCCORMICK, F. (1996): Ras biology in atomic detail. *Nature structural biology* 3, 653.

MCGOWAN-JORDAN, J., SIMONS, A., SCHMID, M. (2016): *ISCN 2016, An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*. Švýcarsko: Karger, ISBN: 978-3-318-05857-4.

MIČKOVÁ, P., BALCÁRKOVÁ, J., PIKA, T., BAČOVSKÝ, J., MINAŘÍK, J., NEVIMOVÁ, K., JAROŠOVÁ, M. (2014): Delece genu TP53 u nemocných s mnohočetným myelomem a monoklonální gamapatií nejistého významu – molekulárně cytogenetická analýza souboru 84 nemocných. *Transfúze a hematologie dnes* 20, 32-38.

MLYNÁRČIKOVÁ, M., BALCÁRKOVÁ, J., MIČKOVÁ, P., ŠČUDLA, V., PIKA, T., BAČOVSKÝ, J., MINAŘÍK, J., JANOUŠOVÁ, E., JAROŠOVÁ, M. (2016): Molecular cytogenetic analysis of chromosome 8 aberrations in patient with multiple myeloma examined in 2 different stages, at diagnosis and at prognosis/relapse. *Clinical lymphoma, myeloma and leukemia* 16, 358-365.

MOHTY, M., HAROUSSEAU, JL. (2015): Handbook of multiple myeloma. New York: Springer, ISBN 978-3-319-18217-9.

NĚMEC, P., ZEMENOVÁ, Z., GREŠLÍKOVÁ, H., MICHALOVÁ, K., FILKOVÁ, H., TAJTLOVÁ, J., KRÁLOVÁ, D., KUPSKÁ, D., SMETANA, J., KREJČÍ, M., POUR, L., ZAHRAĐOVÁ, L., SANDECKÁ, B., ADAM, Z., BUCHLER, T., ŠPIČKA, I., GREGORA, E., KUGLÍK, P., HÁJEK, R. (2010): Gain of 1q21 Is an Unfavorable Genetic Prognostic Factor for Multiple Myeloma Patients Treated with High-Dose Chemotherapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 16, 548-554.

O'CONNOR, C. (2008): Karyotyping for chromosomal abnormalities. *Nature Education* 1:27.

PALUMBO, A., AVETT-LOISEAU, H., OLIVA, S., LAKHORST, H.M., GOLDSCHMIDT, H., ROSINOL, L., MOREAU, P. (2015): Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of Clinical Oncology* 33, 2863–2869.

PECKA, M. (2002): Laboratorní hematologie v přehledu, buňka a krvetvorba. Český Těšín: FINIDR, ISBN 80-86682-01-3.

PRIDEAUX, S.M., O'BRIEN, E.C., CHEVASSUT, T.J. (2014): The Genetic Architecture of Multiple Myeloma. *Advances in Hematology* 2014, ID 864058, 16 stran.

PROVAN, D., GRIBBEN, J. (2010): *Molecular hematology*, 3th ed. Wiley-Blackwell, ISBN 978-1-405-18231-7.

RACK, K., VIDREQUIN, S., DARGENT, JL. (2016): Genomic profiling of myeloma: the best approach, a comparison of cytogenetic, FISH and array-CGH of myeloma cases. *Journal of clinical pathology* 69, 82-86.

RAJAN, A.M., RAJKUMAR, S.V. (2015): Interpretation of cytogenetic results on multiple myeloma for clinical practise. *Blood Cancer Journal* 5, e365.

RAJKUMAR, S.V. (2016): Multiple Myeloma: 2016 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *American journal of hematology* 91, 713-734.

ROY, P., SARKAR, U., BASAK, S. (2018): The NF- κ B Activating Pathways in Multiple Myeloma. *Biomedicines* 6, 59.

RYLAND, G.L., DOYLE, M.A., GOODE, D., BOYLE, S.E., CHOONG, D.Y.H., ROWLEY, S.M., LI, J., AUSTRALIAN OVARIAN CANCER STUDY GROUP, BOWTELL, D., TOTHILL, R.W., CAMPBELL, I.G., GORRINGE, K.L. (2015): Loss of heterozygosity: what is it good for? *BMC Medical Genomics* 8, 45.

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

SCHRECK, R.R., DISTÈCHE, C. M., *Chromosome Banding Techniques* (2001): Chromosome banding techniques. *Current protocols in human genetics*, chapter 4, unit 4.2.

SMETANA, J., DEMENTYEVA, E., KRYUKOV, F., NĚMEC, P., GREŠLÍKOVÁ, H., KUPSKÁ, R., MIKULÁŠOVÁ, A., IHNÁTOVÁ, I., HÁJEK, R., KUGLÍK, R. (2014a): Incidence of cytogenetic aberrations in two B lineage subpopulations in multiple myeloma patients analyzed by combination of whole-genome profiling and FISH. *Neoplasma* 61, 48-55.

SMETANA, J., FROHLICH, J., ZAORALOVÁ, R., VÁLLOVÁ, V., GREŠLÍKOVÁ, H., KUPSKÁ, R., NĚMEC, P., MIKULÁŠOVÁ, A., ALMÁŠI, M., POUR, L., ADAM, Z., SANDECKÁ, V., ZAHRADOVÁ, L., HÁJEK, R., KUGLÍK, P. (2014b): Genome-Wide Screening of Cytogenetic Abnormalities in Multiple Myeloma Patients Using Array-CGH Technique: A Czech Multicenter Experience. *BioMed research international* 2014, 209670.

SMETANA, J., OPPELT, J., ŠTORK, M., POUR, L., KUGLÍK, P. (2018): Chromothripsis 18 in multiple myeloma patient with rapid extramedullary relapse. *Molecular cytogenetics* 11, 7.

STICCA, T., CABERG, JH., WENRIC, S., POULET, CH., HERENS, CH., JAMAR, M., JOSSE, C., EL GUENDI, S., MAX, S., BEGUIN, Y., GOTHOT, A., CAERS, J., BOURS, V. (2016): Genomic Studies of Multiple Myeloma Reveal an Association Between X Chromosome Alterations and Genomic Profile Complexity. *Genes Chromosomes Cancer* 56, 18-27.

STRACHAN, T., READ, A.P. (2011): *Human molecular genetics*. 4th ed. New York: Garland Science, ISBN 978-0815341499.

ŠÁLEK, T. (2008): Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu. *Interní medicína* 10, 407–409.

ŠČUDLA, V., MINAŘÍK, J., PIKA, T., BAČOVSKÝ, J. (2017): Diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatií z pohledu klinické praxe I. Maligní monoklonální gamapatie. *Interní medicína* 19, 274–278.

ŠTORK, M., VACULOVÁ, J., POUR, L., SANDECKÁ, V., ADAM, Z., KŘEJČÍ, M., KRÁL, Z. (2017): Novinky v léčbě mnohočetného myelomu. *Interní medicína* 19, 20–22.

THERMO SCIENTIFIC. Příručka NanoDrop 1000 [online]. [cit. 2019-22-1]. Dostupné z: <https://www.baylor.edu/bsb/doc.php/210102.pdf>.

THERMO SCIENTIFIC. Příručka Qubit 2.0 Fluorometer [online]. [cit. 2019-22-1]. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell-tissue-analysis/qubit-all-file-types.par.0519.file.dat/qubit-2-fluorometer-user-manual.pdf>.

UHRIQ, S., SCHUFFENHAUER, S., FAUTH, C., WIRTZ, A., DAUMER-HAAS, C., APACIK, C., COHEN, M., MULLER-NAVIA, J., CREMER, T., MURKER, J., SPEICHER, M.R. (1999): Multiplex-FISH for pre-and postnatal diagnostic applications. *American journal of human genetics* 65, 448–462.

WALKER, B.A., LEONE, P.E., CHIECCHIO, L., DICKENS, N.J., JENNER, M.W., BOYD, K.D., JOHNSON, D.C., GONZALEZ, D., DAGRADA, G.P., PROTHEROE, R.K.M., KONN, Z.J., STOCKLEY, D.M., GREGORY, W.M., DAVIES, F.E., ROSS, F.M., MORGAN, G.J. (2010): Compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 116, e56-e65.

WALKER, B.A., LEONE, P.E., JENNER, M.W., LI, CH., GONZALEZ, D., JOHNSON, D.C., ROSS, F.M., DAVIES, F.E., MORGAN, G.J. (2006): Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 106, 1733-1743.

WALKER, B.A., MORGAN, G.J. (2006): Use of single nucleotide polymorphism-based mapping arrays to detect copy number changes and loss of heterozygosity in multiple myeloma. *Clinical lymphoma & myeloma* 7, 186-191.

WALKER, B.A., WARDELL, C.P., BRIOLI, A., BOYLE, E., KAISER, M.F., BEGUM, D.B., DAHIR, N.B., JOHNSON, D.C., ROSS, F.M., DAVIES, F.E., MORGAN, G.J. (2014): Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood cancer journal* 4, e191.

WITTINGHOFER, A. (1998): Signal transduction via Ras. *Biological chemistry* 379, 933.

ZHAN, F., HUANG, Y., COLLA, S., STEWART, J.P., HANAMURA, I., GUPTA, S., EPSTEIN, J., YACCOBY, S., SAWYER, J.P., BURINGTON, B., ANAISSIE, E., HOLLMIG, K., PINEDA-ROMAN, M., TRICOT, G., VAN RHEE, F., WALKER, R., ZANGARI, M., CRAWLEY, J., BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY, J.D. (2006): The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108, 2020-2028.

9. Přílohy

Příloha 1: Zázpis genetických změn dle nomenklatury ISCN celého souboru 51 pacientů

Pacient 1

arr[GRCh37]

1p35.3p35.1(29047498_32816261)x1,1p34.1p11.2(44179590_121330906)x1,2q24.1q37.2(156446379_236905092)x1,9p13.1p11.2(40322535_43841603)x1,(13)x1,(22)x1,(Y)x0

Pacient 2

arr[GRCh37]

1p33p12(48840116_120520278)x1,(5)x3,6q22.31q27(124165678_170884575)x1,(9)x3,(11)x3,(15)x3,18q12.2q23(34070321_78012829)x3,(19)x3,(21)x3,(X)x1

Pacient 3

arr[GRCh37]

13q14.11q14.3(40665385_53399029)x1,Yq11.223q11.23(25296950_26435098)x0

Pacient 4

arr[GRCh37]

1p36.33p32.3(1040513_55848004)x3,1q32.1(200932892_204664839)x3,3p22.1p21.1(42262765_52657626)x3,3q11.1q29(93538467_197861598)x3,4p16.2p16.1(4865225_10403713)x3,(5)x3,(7)x3,8p23.3p11.21(1920901_42359829)x1,8q24.23q24.3(139229011_146280020)x3,9p24.3p11.2(115981_46933102)x3,9q12q34.3(65632517_141006466)x4,(11)x3,(15)x4,16q23.3q24.3(83972303_90059332)x3,17q25.1q25.3(71211006_80914321)x3,(19)x3,(22)x3,(X)x1

Pacient 5

arr[GRCh37] 1p22.2p12(89757314_118765307)x1,(5)x3,(9)x3,(11)x3,(15)x3,(19)x3

Pacient 6

arr[GRCh37]

1p36.22p34.2(11776333_42214880)x1,1q21.1q25.1(146646319_174037265)x3,1q25.1q25.3(174080193_185342150)x1,1q25.3q41(185746131_215402244)x3,1q41(221782735_222540546)x1,1q42.13q43(230483994_243095932)x3,6q11.1q27(62236595_170911240)x1,(13)x1,16q11.2q24.3(46441545_90148393)x1,(22)x1,(X)x1

Patient 7

arr[GRCh37] (3)x3,(5)x3,(7)x3,(9)x3,(11)x3,(13)x1,(15)x3,(17)x3,(19)x3,(21)x3

Patient 8

arr[GRCh37]

1q24.2q31.3(170282953_195932360)x3,1q32.1(201139287_201958352)x1,1q32.1q42.2(203892416_232605805)x3,1q42.2(232675035_233167357)x1,1q42.3(234747397_235476995)x3,1q43(237707050_240571037)x3,1q43(242332337_243063428)x3,1q43(240784675_242300843)x1,1q43q44(243288228_243880158)x1,1q44(245544133_249123865)x3,(3)x3,5p15.33p11(22149_46365277)x3,5q11.1q12.3(49638923_65506109)x3,5q12.3q35.3(65120054_180614665)x2 hmz,5q35.2q35.3(173175787_178917594)x1,6q25.1q25.2(151896095_155043925)x1,(8)x3,(9)x4,(11)x3,12p12.2p12.1(20687805_21860299)x1,14q32.11q32.12(91162751_93723598)x1,(15)x3,16q12.1q24.3(51326642_90115921)x2 hmz,(19)x3,Xq23q28(110398005_155198481)x2

Patient 9

arr[GRCh37]

1q21.1q44(143730352_249212668)x3,(3)x3,5p15.33p14.3(22149_22582893)x3,6q15q21(91755854_112351032)x1,7q33q36.3(137661280_159124131)x3,8q24.21q24.3(128382412_146280020)x3,10p15.3p14(102539_8001869)x1,(13)x1,(15)x1,(X)x1

Patient 10

arr[GRCh37] (3)x3,(4)x3,(9)x3,(11)x3,(13)x1,(15)x3,(19)x3,(X)x1

Patient 11

arr[GRCh37]

1q21.1q44(144071959_249212668)x4,(3)x3,(6)x3,(7)x3,8p23.3p11.23(191530_38033251)x1,9p24.3p22.2(146188_17880067)x3,9q12q34.3(65632517_141089296)x3,11q14.1q23.3(82872416_116935056)x1,(13)x1,14q21.3q32.33(49696577_107287505)x1,(15)x3,17q21.33q25.3(47423234_81039514)x3,(18)x3,19p13.3p11(259395_24507409)x3,19q11q12(27764285_31139543)x3

Pacient 12

arr[GRCh37]

1p31.3p12(66372237_118846476)x1,1q21.1q44(144071959_249212668)x3,2p24.3p24.2
(16080720_17683343)x3,?8p23.1(7053186_7691960)x3,(13)x1,16q21q24.3(59008626_90
094484)x1,19q11q13.43(27962582_59091182)x1,(22)x1,(X)x1

Pacient 13

1q21.1q44(142617943_249212668)x4,6q22.33q27(128345254_170890108)x1,16q11.2q24
.3(46615096_90115921)x2 hmz,?22q11.22(22780968_23012072)x0,?22q11.22(23056562
_23228483)x0,(X)x1

Pacient 14

arr[GRCh37]

1q21.1q44(143730352_249212668)x3,(3)x4,(5)x4,6p25.3p12.2(206749_52879298)x3,(9)x
4,(11)x4,(15)x4,16p13.3p11.2(96766_29592842)x3,(17)x4,(19)x4,Xq27.3q28(142311950
_155232907)x3

Pacient 15

arr[GRCh37]

1q21.1q44(145415190_249212668)x3,(3)x3,(5)x3,(7)x3,8p23.3p11.21(311957_41658036)
x1,(9)x3,(11)x3,(13)x1,(15)x3,(19)x3,20p13p12.2(60747_11518047)x1,(21)x3

Pacient 16

arr[GRCh37]

1p36.12p35.3(21782667_30054671)x1,1q21.1q44(143730352_249212668)x4,4q12q13.2
(58132736_68236525)x1,4q21.3q22.1(86972445_90705410)x1,8p23.3p12(240269_31141
343)x1,(13)x1,(14)x1,15q15.2q26.3(42830424_102465355)x4,20p13p11.21(65043_22840
889)x1

Pacient 17

arr[GRCh37]

1q21.1q44(142824780_249212668)x3,3p26.3p21.1(62199_53378986)x3,3p12.3p11.1(78580760_90458199)x3,3q11.1q29(93538467_197861598)x3,5q34q35.3(163780787_180696806)x3,6p25.3p12.3(213630_48346293)x3,6q22.31q27(124868787_170881704)x1,7p22.3p15.3(101528_21038056)x1,7p15.3p14.3(21071112_29756845)x4,7p14.3p14.2(29800160_36491899)x3,7q11.22q11.23(68700261_73096487)x3,7q11.23q21.12(74133273_87639314)x3,7q21.12q21.13(87667646_88512733)x1,7q21.13q21.3(88555184_94678527)x4,7q22.1q22.3(95515297_111179569)x3,7q21.12q21.13(87667646_88512733)x1,7q31.31.q36.3(116702041_162226409)x3,8p23.3p21.1(191530_28235633)x1,8p21.1p11.21(28285903_41140580)x3,(9)x3,(11)x3,13q11q12.11(19024748_22196241)x3,13q12.11q13.1(23173103_33956420)x1,13q13.3q14.2(36667248_47577906)x3,13q14.2q34(47627779_114998620)x1,(15)x3,19p13.3p11(686653_24474254)x3,20p13p11.22(65043_22010779)x1,20p11.22p11.1(22145571_26312663)x3,20q11.21(29842786_30118643)x1,20q11.21(30197621_30889974)x3,20q11.21q11.22(30921700_32180653)x1,20q11.22(32224505_32682043)x3,20q11.22(32714133_33579620)x1,20q11.22(33610447_33928284)x3,20q11.22(33933400_34013626)x1,20q11.22q11.23(34017929_34426453)x3,20q11.23q13.2(34450946_50730774)x1,(21)x3,Xp22.33p11.1(192689_58297997)x1,Xq11.1q24(61998756_118946727)x1

Pacient 18

arr[GRCh37]

1p36.31p11.2(6978623_121306168)x2 hmz,1q21.1q44(144674799_249212668)x3,4p15.33(11366016_15191532)x2 hmz,4p15.1p12(31354139_47557485)x2 hmz,4q13.1q35.2(60254101_190449761)x2 hmz,(5)x3,6q25.1q27(151924555_170884575)x1,7p22.3p14.3(884743_31302123)x2 hmz,7p14.3p11.2(31359084_57923933)x3,7q11.21q36.3(61798988_164576836)x3,7q31.1(107651361_113266379)x2 hmz,8q24.13q24.21(126349400_128484268)x1,(9)x3,(10)x3,(11)x3,(13)x1,(15)x3,17p13.3p11.2(72083_20819895)x2 hmz,17q11.2q25.3(30916752_80958632)x2 hmz,17q21.31q25.3(42036525_81021692)x3,(19)x3,(20)x3,Xp22.33p11.1(305449_58543823)x1,Xq11.1q26.3(61998756_136750682)x1

Patient 19

arr[GRCh37]

1p36.13p35.2(18962095_31825818)x2 hmz,1p32.2p13.1(58227195_117783727)x2 hmz,
1q21.1q44(142617943_249212668)x3,(2)x3,(3)x3,5p15.31p14.2(9246599_24160482)x
2 hmz,5p14.2p12(24108367_44576159)x3,5q11.1q35.3(49478288_180696806)x3,6q22.31
q22.33(124621369_129612624)x2 hmz,(7)x3,8p23.3p11.1(194617_43364903)x1,(9)x3,10
p15.3p15.2(307807_3682523)x2 hmz,10p15.1p13(4328523_13494594)x2 hmz,10p13p11.
22(14738106_33324516)x2 hmz,10q11.21q26.3(43087295_135331097)x2 hmz,(11)x3,
(15)x3,16p13.3(96766_4694952)x1,16q11.2q12.2(46615096_53054491)x2 hmz,6q21q243
(58845680_90115921)x2 hmz,(18)x1,19p13.3p11(259395_24507409)x4,19q12q13.43(277
64285_59095418)x2~3,(21)x3,Xq27.2q28(141626269_155226944)x3

Patient 20

arr[GRCh37]

1q21.1q44(142617943_249212668)x4,(2)x3,(3)x3,(5)x3,(6)x3,(7)x3,(9)x3,(11)x3,(12)x3,
(14)x3,(15)x4,16p13.3p11.1(96766_35137025)x3,(17)x3,(19)x3,(20)x3,(21)x3,(22)x3,Xp2
2.33p11.1(547419_58463503)x1,Xq11.1q21.32(62021965_91801550)x1

Patient 21

arr[GRCh37]

1q21.1q44(144071959_249212668)x4,6q11.1q27(63085396_170921089)x1,10q26.3(1319
62981_135434178)x1,13q12.11q31.1(19590141_82019403)x1,14q24.1q32.33(69277445_
107284531)x1,15q11.1q26.3(20055137_102383473)x3,16p13.3p13.13(96766_12017813)
x1,16q11.2q24.3(46467474_90148393)x1,Xq27.3q28(145238203_155226944)x3

Patient 22

arr[GRCh37]

1q21.1q44(143730352_249212668)x4,6p25.3p21.33(206749_30844216)x3,(13)x1,14q24.
1q32.33(69260718_106304840)x1,?15q11.1q13.1(20055137_29641211)x2~3,(X)x1

Pacient 23

arr[GRCh37] 1p36.33p12(1492371_120378436)x1~2,2p16.3p16.2(49454482_53685611)x2~3,2p12p11.2(79562513_83911001)x2~3,5p14.3p13.3(20160410_31463067)x2~3,6q11.1q27(61971892_170896033)x1,9p24.3p13.2(291349_36442254)x1,(13)x1,Xq21.31q28(87093771_155115969)x3

Pacient 24

arr[GRCh37]
1q21.1q44(144009907_249212668)x3,10p15.3p12.31(136361_19931149)x1,13q11q34(19024748_115092648)x1,15q26.1q26.3(91522536_102399819)x1,Xp22.33p11.23(3156766_47474931)x1, Xq11.1q25(62021965_128352406)x1

Pacient 25

arr[GRCh37] (1-7)x3,(9)x3,(11)x3,(13)x1,(15)x3,18p11.21(14537508_15362169)x3,(17)x3,(21)x3,Xp22.33(316344_2685674)x1,(Y)x0

Pacient 26

arr[GRCh37] 1q21.1q44(143730352_249212668)x3,(13)x1,(X)x1

Pacient 27

arr[GRCh37]
1q21.1q44(143730352_249212668)x3,3p12.2p11.1(83189043_88863758)x3,3q11.1q29(93538467_197837049)x3,5p15.33p11(22149_46365277)x4,5q11.1q12.1(49478288_58940654)x3,5q23.3q35.3(128193954_180696806)x3,(6)x3,(7)x3,7q22.3q36.3(106558181_159124131)x4,8p23.3p11.1(240269_43708292)x1,8q11.1q12.1(46924418_61347925)x1,8q12.3(63004285_64554525)x1,12q24.13q24.33(112790820_133743506)x3,(13)x1,(15)x4,19p13.3p11(259395_24526398)x3,(22)x1,(X)x1

Pacient 28

arr[GRCh37]

1p35.1p32.1(34284034_60918049)x1,1p31.1p12(81004954_118983652)x1,1q21.1q44(142617943_249212668)x3,2q33.1(197429746_200845677)x3 hmz,(3)x3,(5)x3,5p15.33p15.1(2855305_16295283)x3 hmz,5p15.1p14.1(16664240_25616251)x3 hmz,5p13.3p12(30961417_44163404)x3 hmz,5q23.3q31.1(129847498_135249843)x3 hmz,9p24.3p11.2(115981_46933102)x4,9q12q34.3(65632517_141089296)x3,(11)x3,15q11.2q13.1(23889686_29603988)x3,16p13.3(2722049_3227952)x1,16q11.2q24.3(46467474_90148393)x1,(19)x3,(21)x3,Yq11.21q11.23(13943336_26344878)x0

Pacient 29

arr[GRCh37]

1q21.1q44(143730352_249212668)x3,(3)x3,4p16.3p16.1(64577_9371067)x1,(5)x3,5q23.3q31.1(128132323_131675408)x3 hmz,(7)x3,(9)x4,(11)x3,(15)x4,17q22q24.1(57533489_63314560)x2 hmz ,(19)x3,(21)x3

Pacient 30

arr[GRCh37]

1p22.3p11.2(86196620_121330906)x1,2q35(216920347_219120986)x1,2q36.1q36.3(222464063_226427293)x1,(3)x3,4p16.3p16.2(4249253_4564372)x1,4p16.1p15.33(10337237_12011753)x1,4p15.31(19771968_20318195)x1,4q13.3q21.1(76296652_76817943)x1,4q21.22q22.1(83264080_89272748)x1,4q22.3q23(97055515_99127274)x1,4q26q27(120742607_123773918)x1,4q31.1q31.21(139685358_142357016)x1,5p15.33p11(22149_46215710)x3,5q11.1q13.1(49831223_67571258)x3,5q31.1q35.3(134410377_180567613)x3,8q24.13q24.21(126511236_130044981)x1,(9)x3,(11)x3,12q12q13.13(38613385_52048654)x1,14q22.1q31.1(52440809_82140662)x1,(15)x3,16p12.3(19532805_20564716)x1,17q22(50920907_53382447)x1,(18)x3,19p13.3p11(259395_24507409)x3,19p12(20140470_24377112)x4,19q12q13.2(29690044_42373546)x4,19q13.31q13.43(44094526_59042705)x3,(21)x4

Pacient 31

arr[GRCh37]

1q21.1q44(144009907_249212668)x3,16q11.2q24.3(46467474_90148393)x1,Xp22.33(60701_2685674)x1,(Y)x0

Pacient 32

arr[GRCh37]16p13.3p13.2(1065592_9493376)x1,16q11.2q24.3(46441545_90099677)x1

Pacient 33

arr[GRCh37]

(5)x3,(7)x3,(9)x3,(13)x1,(15)x3,16q11.2q24.3(46500741_90078143)x1,18p11.32(1167292_2682098)x1,(19)x3

Pacient 34

arr[GRCh37]

(5)x3,6p25.3p12.1(362231_56634993)x3,(9)x3,(11)x3,(15)x4,16q22.2q24.3(71254066_90148393)x1,18p11.31p11.23(3453241_8108366)x2~3,18q12.1q23(30009423_78012829)x3,(19)x3,(21)x4

Pacient 35

arr[GRCh37]

1p35.2(30715478_31307311)x1,1p34.3(38207165_38802448)x1,1p21.1(102785376_106236501)x1,1p13.2p12(115646217_118185607)x1,2p13.3p13.2(71418725_72706925)x1,(3)x3,4q26(117011241_119641941)x2 hmz,5p13.3p13.2(32067166_34811080)x2 hmz,6p22.2p22.1(26410524_29702709)x2 hmz,6q13(72240225_72710237)x1,8p23.3p22(191530_17145542)x1,8q24.13q24.21(126328459_128698737)x1,(9)x3,(11)x3,(15)x4,17q21.31(41877134_43236752)x1~2,19p13.3p11(259395_24507409)x3,19p13.11p12(19547226_24259542)x3,19q12q13.11(28651480_35302088)x2 hmz,19q13.11q13.32(35465897_45393473)x2 hmz,19q13.12q13.13(36214910_38425745)x1,19q13.41q13.43(52837937_58258120)x2 hmz,21q11.2q21.1(14389029_19767592)x3,21q22.12q22.3(37399448_48090317)x3,(X)x1

Pacient 36

arr[GRCh37] 4p16.3(72447_1850806)x1,(13)x1,(14)x1,(X)x1

Patient 37

arr[GRCh37]

1p31.3p12(68489408_120520278)x1,(5)x3,6q11.1q12(61971892_63824175)x1,(7)x3,8p23.3p11.21(191530_41831254)x1,(9)x3,(11)x3,(13)x1,(15)x3,16q11.2q24.3(46441545_90148393)x1,17p11.2(20702553_21813712)x1,17q11.1q21.31(25343175_42278429)x1,17q23.2q24.1(60845129_62850691)x1,(19)x3,(20)x3,(22)x1,(X)x1

Patient 38

arr[GRCh37]

3p24.1p22.3(29405895_34796940)x3,(4)x1,6p24.3(7882687_10384798)x3,6p22.1p21.32(28666453_33111420)x3,6q16.3q21(104108330_109329111)x3,6q22.1q22.31(117577315_122668721)x3,7q32.1q33(128065447_133809767)x3,8q24.13q24.21(126671345_129261416)x3,9q33.3q34.12(128008166_133547020)x3,11q12.3q13.2(63032987_67574402)x3,(13)x1,16p13.3p12.3(99417_18306854)x1,16p12.3p11.2(19032873_34427859)x3,16q11.2q24.3(46467474_90148393)x1,(17)x1,19p13.3(259395_5106054)x3,20q13.33(60727816_62904501)x3,22q11.21q13.1(19749830_39675915)x3

Patient 39

arr[GRCh37]

1q21.1q44(142617943_249212668)x4,1q43q44(237516073_249166593)x2 hmz,(2)x3,(3)x3,(5)x3,(6)x3,(7)x3,(9)x3,(11)x3,(15)x3,(17)x3,(18)x3,(19)x3,Yp11.2(6592868_9901780)x0,Yq11.21q11.223(13872502_25767784)x0

Patient 40

arr[GRCh37]

1p22.2p21.2(90331564_101846441)x1,(3)x3,5p15.33p11(22149_46365277)x3,5q11.1q34(49478288_165782441)x3,8q12.1q24.3(60026663_146280020)x3,(9)x3,(11)x4,(15)x4,16p13.3p11.1(134248_35194100)x3,(18)x3,(19)x4,20p13p11.1(60747_26312663)x3,20p11.22p11.1(22087853_26312663)x4,20q11.21q11.23(29462044_35504355)x3,20q11.23q13.2(35842306_54927939)x1,20q13.2q13.33(54958300_62899267)x4,(21)x3,Xq21.2q21.31(85352334_86600708)x2,Xq21.31q28(89199234_154560375)x2,Yp11.2(3509579_6893402)x2

Pacient 41

arr[GRCh37]

1q21.3(152640479_154841595)x3,3p25.2p25.1(12187872_14453219)x3,3q26.2q26.31(168719118_171149080)x3,6p21.31p21.2(35740121_37849852)x3,6q16.3q21(105421649_107619402)x3,8q24.21(128648487_129425474)x1,7q22.1(101126335_103132441)x3(13)x1,(14)x1,14q12(30449092_32846531)x2,(16)x1,17p11.2(16720871_18921097)x3,17q12(32496384_34424748)x3,17q22q25.3(52485705_81044553)x3,17q23.2q24.1(59367029_63490719)x4,19q13.33(48968402_50950680)x3,(22)x1,22q12.3q13(36464372_38580773)x2,(X)x1

Pacient 42

arr[GRCh37]

1p36.33p36.23(807685_7871366)x3,1p32.3(50865787_51878355)x0,1p32.3p31.3(53510822_61445088)x2 hmz,1p31.3p22.3(61996692_85342748)x3,1p22.3p21.1(85365635_102207462)x1,1p21.1p11.2(102273604_121330906)x3,1q21.1q44(142824780_249212668)x3,3q24q29(147915914_193017233)x3,3p26.1(4070291_4134283)x3,3q26.1(162594594_165891343)x3,4q24(106111275_106744912)x1,8p22p11.21(18438465_39792807)x1,(9)x3,11q22.1q25(100173136_134934196)x3,14q23.1q31.3(60530055_88407784)x1,17q21.31(41759364_43441457)x1,(19)x3

Pacient 43

arr[GRCh37]

1p31.1p11.2(74726455_121330906)x1,1p21.1(102990985_103318451)x0,5q35.1(172660775_172661204)x1,6q22.33q26(127544157_162267815)x1,11p11.2p11.12(46024843_50620548)x1,(13)x1,(14)x1,16p11.2p11.1(32335047_35113730)x3,16q12.1q12.2(47814219_54856294)x3,16q21(60925857_65998519)x3,16q23.2q24.2(80751188_87905291)x3,17q23.2(58829418_59652660)x1,(X)x1

Pacient 44

arr[GRCh37]

1q21.2q25.2(149275080_176892340)x3~4,1q25.3q31.2(185240459_191717311)x3~4,1q32.1q32.2(203305026_209685703)x4,1q32.2q41(209742722_218811390)x3,1q41q44(218838601_249212668)x4,3q24q29(146305030_197861598)x3,4q24q35.2(105634312_190790881)x1,6q26q27(161564505_170906796)x1,8p23.3p11.21(191530_40616460)x1,8q23.2q24.13(111447022_125587953)x3,8q24.13(125617565_125993681)x1,8q24.13(126051397

_126302428)x3,8q24.13q24.21(126328459_127439221)x1,8q24.21(127481731_131322268)x3,8q24.21(129446649_129841304)x1,8q24.21q24.3(131353493_146280020)x1,8q24.22(131884693_132023313)x3~4,8q24.22(133790625_134143656)x3,8q24.22(134873947_135644786)x3,8q24.22q24.3(135670195_140946683)x1,8q24.3(140980052_141447833)x3,8q24.3(141580927_146123865)x1,9p13.1p12(40802800_42372691)x1,(13)x1,16p13.3p13.2(3708012_10124105)x1,16p12.3(16933627_17929552)x1,16p12.3p11.2(19498295_28881340)x1,16p11.2(30442107_33773134)x1,16p11.2p11.1(34202088_35177478)x1,16p11.1(35024449_35033409)x0,17p13.3p11.2(24457_22183006)x1,17q11.2(29217814_31379356)x1,17q21.2q21.31(39288443_43570427)x1,(X)x1

Pacient 45

arr[GRCh37]

1q21.1q44(142617943_249212668)x3,3p26.3p11.1(117735_90458199)x3,3q13.2q13.31(11999819_114314402)x3,3q13.33(119695946_120515873)x3,3q21.3(126878557_128569154)x3,3q22.1(129972848_130720974)x3,(4)x3,5p15.33p11(22149_46365277)x3,5q11.2q13.3(56798441_76865969)x2 hmz,5q14.2q14.3(81471638_89584850)x2 hmz,5q21.1q23.1(101658000_119456935)x2 hmz,5q23.2q23.3(124631575_130005745)x2 hmz,5q33.2q35.3(155086996_179392075)x2 hmz,6p25.3p11.1(209457_58774324)x3,6q11.1q12(61971892_69420159)x3,6q13q14.1(74118940_76789152)x1,6q14.1(80142984_80976509)x3,6q14.3q15(87862808_88537093)x3,6q15q27(88557963_170890108)x1,7q31.31q32.1(12081719_127775349)x2 hmz,7q33q34(134725826_140727688)x2 hmz,(11)x3,(13)x1,(15)x4,(18)x3,18q12.1q12.2(29841532_34504970)x2 hmz,(19)x3,20q12(38481400_39633087)x1(21)x3

Pacient 46

arr[GRCh37]

3p26.3p11.1(267116_90458199)x3,3q11.1q29(93538467_197861598)x3,?3q26.1(160981478_166246101)x4,5p15.33p11(57640_46365277)x3,5q11.1q31.3(49478288_140044841)x3,6p25.3p11.1(794273_58774324)x3,6q25.2q27(153880888_170911240)x3,(9)x4,10q11.22(46949255_48124262)x0~1,10q24.31q25.1(101953972_106972462)x1,(11)x3,(15)x4,19p13.3p11(259395_24507409)x4,19q11q13.11(27764285_33640341)x4,19q13.11q13.43(33351581_59095418)x3

Pacient 47

arr[GRCh37]

(13)x1,16q23.2q24.3(81142875_90118285)x1,17q11.2(27217713_29672302)x1,(22)x1,
Yq11.21q11.221(14571576_16529847)x0

Pacient 48

arr[GRCh37]

1q25.2(178044910_179202233)x3,1q31.1q31.2(187722751_191218677)x2 hmz,1q42.12
(225462314_226703865)x3,2p21p16.3(47632824_52031269)x2 hmz,3q22.1q22.2(132737
851_133825556)x3,?4q32.1(159382764_160477594)x3,?4q35.1(184717878_185787268)
x3,5q23.3q31.3(129950008_143703870)x1,?6p21.2(36619837_37728170)x3,7p21.1p15.3
(19522027_21861028)x2 hmz,8p23.1(7169490_7752586)x1,?8q22.3(103106336_1042418
68)x3,10q23.31q24.1(92361911_97260248)x2 hmz,11q23.3(116462497_117614522)x3,
12q12(38545033_41842288)x2 hmz,12q15(68343398_69466401)x3,12q15(68343398_69
466401)x3,?12q24.31(122944206_123952153)x3,13q14.2q34(49614224_115092648)x1,
14q11.2(19376762_20421677)x1,14q12(26011725_29204879)x1,14q23.1q32.12(6091618
2_94410646)x1,15q15.3(43694658_44799689)x3,16p13.2(8431116_9598226)x1,16p13.1
3(11378227_12422603)x3,16q11.2q24.3(46467474_90148393)x1,17p13.3p11.2(36617_2
2032763)x1,17q11.1q21.31(25343175_43154544)x1,17q25.3(75684939_76588515)x3,21
q22.3(44445340_45452620)x3,22q11.21(20279766_20659606)x1,22q11.23q12.1(256725
85_25903543)x1,22q13.1q13.33(40291318_51224252)x1,Xq27.1q28(139584651_154931
043x2,154931044_155208244)x3

Pacient 49

arr[GRCh37]

1p34.1p32.3(46426944_51542904)x1,1q21.1q44(143730352_249212668)x4,3q21.2q26.32
(124792224_178056954)x3,5p15.33p11(22149_46365277)x3,5q11.1q12.1(49478288_601
80834)x3,7p21.3p21.2(9475776_15481779)x1,7q11.21q36.3(63249850_159128556)x3,8q
11.21q11.23(50166541_53921485)x2 hmz,(9)x3,11p15.5p15.4(196966_8700302)x1,11p1
5.4p15.2(8742062_14515506)x3,(13)x1,16p11.2(32279544_33563699)x1,16q11.2q24.3
(46500741_90148393)x1,18p11.32p11.21(64847_15362169)x3,18q11.1q22.1(18542074_
64984466)x3,(19)x3,Xq28(147445303_154931043x2,154931044_155198481)x4

Pacient 50

arr[GRCh37]

1p31.1p21.1(84861644_106956990)x1,(2)x2 hmz,(5)x3,(7)x3,(9)x3,14q11.1q32.31(19043189_101939750)x2~3,14q32.31q32.33(102340541_107270326)x1,(18)x3,(19)x3,20p13p11.1(65043_25721248)x1,20q11.21q13.33(29462044_62908674)x3,(21)x3

Pacient 51

arr[GRCh37] (1-22,X)x2 normal female

Příloha 2: Tabulka se stručným shrnutím změn detekovaných metodou FICTION

Číslo pacienta	Zmnožení 1q21	Delece 1p32	Delece genu <i>RBI</i>	Abnormalita zahrnující gen <i>MYC</i>	Změny genu <i>IGH</i>	Cep 15	Cep 17
1		✓	✓	ND	✓		
2		✓		ND		✓	
3			✓		✓		
4				✓		✓	
5				✓		✓	
6	✓		✓	ND			
7			✓	ND		✓	✓
8				ND		✓	
9	✓		✓	✓		✓	
10			✓	ND		✓	
11	✓			✓			
12	✓		✓		✓		
13	✓			ND	✓		
14	✓			ND		✓	✓
15	✓		✓	ND		✓	
16	✓		✓	ND	✓		
17	✓		✓	✓		✓	
18	✓		✓	ND		✓	
19	✓			ND		✓	
20	✓			✓		✓	✓
21	✓		✓	ND	✓		
22	✓		✓	ND	✓	✓	
23		✓	✓	ND	✓		
24	✓				✓		
25			✓		✓	✓	
26	✓		✓	ND	✓		
27	✓		✓			✓	
28	✓	✓		ND		✓	
29	✓					✓	✓
30						✓	
31	✓			ND	✓		
32				ND	✓		
33				✓			
34				ND		✓	
35				✓		✓	
36			✓	ND	✓		
37			✓		✓		
38				✓	✓		
39	✓			ND		✓	✓
40				ND			
41			✓	ND	✓		
42					✓		
43			✓	ND	✓		
44	✓			ND	✓		
45	✓		✓	ND		✓	
46				ND			
47	✓	✓	✓	ND	✓	✓	
48					✓		
49	✓		✓	ND			
50				ND	✓		

Legenda: Cep 15,17 – FISH sondy pro centromerické oblasti, které potvrdily trizomii (příp. tetrazomii) daného chromozomu, ND: vyšetření nebylo provedeno