

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Lenka Hovorková

Patogeneze dětských leukémií

Pathogenesis of childhood leukaemia

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Jan Zuna, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 26. 3. 2020

Lenka Hovorková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Janu Zunovi, Ph.D. nejen za odborné vedení mého postgraduálního studia a projektů s ním souvisejících, ale i za možnost otevřeně debatovat o chybách teoretických i praktických, jež s sebou (nejen) výzkumná činnost přináší. Dále děkuji prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. za možnost účastnit se výzkumu v oblasti dětských leukémií. Veliký dík patří i celému prostředí laboratoří CLIP, a to jak z řad výzkumných pracovníků a studentů, tak i laborantů zabývajících se diagnostikou – děkuji především Ing. Katce Mužíkové, která mě učila základy práce v laboratoři, Mgr. Elišce Streitové, Veronice Grecové a Danielu Thürnerovi, za jejich pomoc v laboratorních nesnázích, Mgr. Martině Zwyrtkové, Mgr. Kateřině Rejlové, Ph.D., Mgr. Violetě Bakardjieva-Mihaylové, MUDr. Olze Zimmermannové, Ph.D., PharmDr. Elišce Potůčkové, Ph.D. a Mgr. Aleně Musilové za nekonečné množství udělených rad a připomínek, prodebatovaných hodin a celkovou snahu o udržení dobré nálady.

Největší dík patří mé – stále se rozrůstající – rodině za podporu, která mi byla poskytována po celou dobu mého, nejen postgraduálního, studia.

Identifikační záznam:

HOVORKOVÁ, Lenka. *Patogeneze dětských leukémií. [Pathogenesis of childhood leukaemia]*. Praha, 2020, 79 stran, 4 přílohy (94 stran). Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie. Vedoucí závěrečné práce prof. MUDr. Jan Zuna, Ph.D.

Klíčová slova: akutní lymfoblastická leukémie (ALL), chronická myeloidní leukémie (CML), BCR-ABL1, minimální reziduální nemoc (MRN), hyperdiploidie, DNA index

Key words: acute lymphoblastic leukaemia (ALL), chronic myeloid leukaemia (CML), BCR-ABL1, minimal residual disease (MRD), hyperdiploidy, DNA index

OBSAH

Abstrakt	7
Abstract	8
Seznam zkratk	9
1 Úvod	11
2 Přehled literatury	12
2.1 BCR-ABL1 pozitivní leukémie	12
2.1.1 Fúzní gen <i>BCR-ABL1</i>	12
2.1.2 Chronická myeloidní leukémie	14
2.1.3 <i>BCR-ABL1</i> -pozitivní akutní lymfoblastická leukémie	16
2.2 Hyperdiploidní leukémie	18
2.3 Minimální reziduální nemoc	20
3 Cíle práce	22
4 Metody a materiál	23
4.1 Skupiny pacientů, zpracování vzorků	23
4.2 Izolace nukleových kyselin, reverzní transkripce	24
4.3 Celogenomová amplifikace	25
4.4 Screening delecí v genu <i>IKZF1</i>	25
4.5 Stanovení genomického přechodu genu <i>BCR-ABL1</i>	25
4.6 Kvantifikace a vyhodnocování minimální reziduální nemoci.....	27
4.7 Definice diskrepantních výsledků při stanovování hladiny MRN	28
4.8 Analýza přechodových sekvencí	29
4.9 Sortování buněk a následná analýza.....	29
4.10 Screening mutací u pacientů s hyperdiploidní leukémií	30
4.11 Hodnocení odpovědi na léčbu	30
4.12 Expresní profilování a analýza dat	30
4.13 Stanovení DNA indexu a variability počtu kopií	31

4.14	Statistická analýza.....	32
5	Výsledky	33
5.1	Leukémie s fúzním genem BCR-ABL1	33
5.1.1	Počty pacientů.....	33
5.1.2	Analýza přechodových sekvencí	33
5.1.3	Celkové srovnání a průběh minimální reziduální nemoci	38
5.1.4	Přítomnost genu <i>BCR-ABL1</i> ve vybraných buněčných subpopulacích.....	42
5.1.5	Leukocytóza a variabilita exprese <i>BCR-ABL1</i> při diagnóze.....	44
5.1.6	Analýza celkového přežití	47
5.2	Hyperdiploidní leukémie	48
5.2.1	Počty chromozomů a korelace s DNA indexem.....	48
5.2.2	Variabilita počtu kopií	49
5.2.3	Mutace v genech signální dráhy RAS a v genu <i>CREBBP</i>	50
5.2.4	Expresní profilování	50
5.2.5	Odpověď na léčbu a analýza přežití.....	53
6	Diskuze	57
7	Závěr	65
8	Přehled publikací a přednášek	66
9	Seznam použité literatury	68
10	Přílohy	79

Abstrakt

Fúzní gen BCR-ABL1 je charakteristický pro pacienty s chronickou myeloidní leukémií (CML), je však možné jej detekovat i u části pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). U pacientů s BCR-ABL1-pozitivní ALL jsou k hodnocení odpovědi na léčbu a stanovení minimální reziduální nemoci (MRN) využívány dva přístupy – kvantifikace klonálních přestaveb imunoreceptorových genů (Ig/TCR) na DNA úrovni a stanovení exprese BCR-ABL1. Zavedli jsme metody k nalezení genomického přechodu BCR-ABL1 a intronové zlomy využili k monitorování MRN i kvantifikací BCR-ABL1 na DNA úrovni. Srovnání hladin MRN získaných kvantifikací přestaveb Ig/TCR a BCR-ABL1 na DNA úrovni u konsektivní kohorty 47 dětských pacientů ukázalo dlouhodobě zvýšené hladiny fúzního genu přibližně u 25 % pacientů. U těchto pacientů bylo možné detekovat fúzní gen nejen v ALL blastech, ale i v buněčných typech, které nenesou klonální přestavby Ig/TCR (T-lymfocyty, myeloidní buňky). Tuto novou podskupinu leukémie s přítomností BCR-ABL1-pozitivních buněk ve více liniích jsme – na základě podobnosti s CML – označili jako „CML-like“. Naše probíhající studie je zaměřena na prognostický vliv tohoto multiliniového postižení.

Celkem jsme genomickou fúzi BCR-ABL1 našli u 428 pacientů (jedná se o dosud nejrozsáhlejší kohortu pacientů), a tak bylo možné provést analýzu fúzních sekvencí. Na základě našich dat se zdá, že za spojení obou fúzních partnerů je zodpovědný proces nehomologního spojování konců.

Na rozdíl od pacientů s BCR-ABL1-pozitivní ALL mají dětské pacienty s vysoce hyperdiploidní (HHD) ALL (s 51 – 67 chromosomy v leukemických buňkách) velmi dobrou prognózu. Některé studie však do skupiny HHD ALL zařazují pacienty s DNA indexem ($DNA_i \geq 1,16$; nezahrnují tak pacienty s nižší ploidií a možnou horší prognózou. Vyšetřili jsme 89 pacientů s HHD ALL s nízkým $DNA_i < 1,16$ (LDi) a vysokým $DNA_i \geq 1,16$ (HDi). Ve skupině pacientů s HDi-HHD bylo více těch s (kombinovanými) trizomiemi s pozitivním prognostickým dopadem (především kombinovaná trizomie 4 a 18) a pacienti s HDi-HHD byli jen vzácně stratifikováni do léčebného ramene s vysokým rizikem relapsu onemocnění. Expresní analýza ukázala na biologické rozdíly mezi HDi-HHD a LDi-HHD pacienty.

Naše data týkající se podskupin BCR-ABL1 a HHD leukémií přináší nové poznatky o biologii dětských leukémií a mohou mít vliv na jejich terapii i prognózu.

Abstract

BCR-ABL1 fusion gene is a hallmark of chronic myeloid leukaemia (CML), but can be found also in patients with acute lymphoblastic leukaemia (ALL). In BCR-ABL1-positive ALL, two principal approaches for treatment response and minimal residual disease (MRD) monitoring are routinely used – quantification of genomic clonal rearrangements of immunoglobulin/T-cell receptor genes (Ig/TCR) and BCR-ABL1 expression. We established methods for determination of BCR-ABL1 genomic fusion and used the intronic breakpoints to measure MRD levels also at the BCR-ABL1 DNA level. Comparison of MRD based on Ig/TCR and genomic BCR-ABL1 in 47 consecutive childhood patients showed poor correlation in about 25 % cases with significantly higher BCR-ABL1 levels. In those patients, we found the BCR-ABL1 not only in ALL-blasts, but also in other cell subtypes (T-cells, myeloid cells) negative for clonal Ig/TCR rearrangements. For the similarity with CML we assigned this new leukaemia subtype with multilineage BCR-ABL1 involvement “CML-like” leukaemia. Our ongoing study is focused on the prognostic implications of discordant MRD results.

As we characterized the genomic BCR-ABL1 fusion in 428 patients (which is to our knowledge the largest cohort described so far), we also analysed the origin of the breakpoints. Our data suggest that non-homologous end joining seems to be the mechanism executing BCR and ABL1 fusion.

In contrary to the BCR-ABL1-positive ALL, childhood high hyperdiploid (HHD) ALL – defined by 51 to 67 chromosomes in malignant cells – have in general very good prognosis. However, some studies consider as HHD only patients with the DNA index (DNA_i) ≥ 1.16 , thus missing patients with lower ploidy and possibly worse prognosis. We investigated 89 HHD ALL patients with low- $DNA_i < 1.16$ (LDi) and high- $DNA_i \geq 1.16$ (HDi). The HDi-HHD subgroup was enriched for (combined) trisomies with positive prognostic effect (particularly combined trisomy 4 and 18) and HDi-HHD patients were only rarely stratified to treatment group with high risk of relapse. Interestingly, expression analysis showed biological differences between HDi-HHD and LDi-HHD subgroups.

Our data both on BCR-ABL1 and on HHD subtypes provide new information on biology of childhood leukaemia with possible therapeutic and prognostic implications.

Seznam zkratek

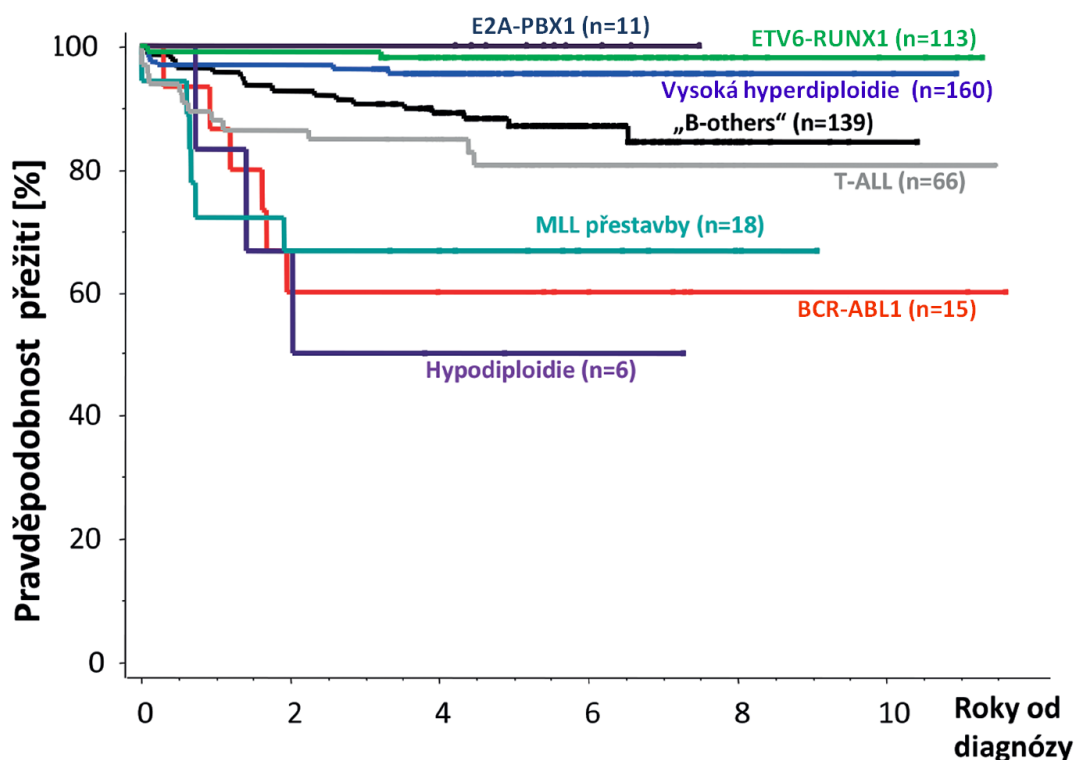
ABL1	Abelsonův gen myší leukémie
AIEOP-BFM	<i>Associazione Italiana di Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Münster Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
APC	<i>Anaphase promoting complex</i>
B2M	Beta-2-mikroglobulin
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
CDC27	<i>Cell division cycle 27</i>
CDKN2A/2B	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A/2B</i>
CML	Chronická myeloidní leukémie
CNV	<i>Copy number variation</i> ; variabilita počty kopií
COG	<i>Children oncology group</i>
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>
DNAi	DNA index
EFS	<i>Event-free survival</i> ; období bez události
EsPhALL	<i>European Intergroup Study on Post Induction Treatment of Philadelphia Positive Acute Lymphoblastic Leukaemia</i>
ETV6	<i>ETS variant 6</i>
EXOSC2	<i>Exosome komponent 2</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FLT3	<i>FMS related tyrosine kinase</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
GUSB	Beta-glukuronidáza
HDi-HHD	<i>High DNAi-high hyperdiploid leukaemia</i> ; hyperdiploidní leukémie s vysokým DNAi
HHD	<i>High-hyperdiploidy</i> ; vysoká hyperdiploidie
HSCT	<i>Haematopoietic stem cell transplantation</i> , transplantace hematopoetických kmenových buněk
Ig	Imunoglobulin
IKZF1	<i>Ikaros zink finger 1</i>
IR	<i>Interspersed repeats</i> , rozptýlené repetice

KD	Kostní dřeň
LD-PCR	<i>Long distance PCR</i>
LDi-HHD	<i>Low DNAi-high hyperdiploid leukaemia</i> ; hyperdiploidní leukémie s nízkým DNAi
LINE	<i>Long interspersed nuclear elements</i>
MRN	Minimální reziduální nemoc
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NES	<i>Normalised enrichment score</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i> ; nehomologní spojování konců
PAX5	<i>Paired box 5</i>
PK	Periferní krev
PTPN11	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
qPCR	<i>Quantitative PCR</i> , kvantitativní PCR
QR	<i>Quantitative range</i> , kvantitativní rozmezí
RAG	<i>Recombination activating genes</i>
RSS	Rekombinační signální sekvence
SINE	<i>Short interspersed nuclear element</i>
SNP	<i>Single nukleotide polymorphism</i>
TCR	T-buněčný receptor
TKD	Transplantace kostní dřeně
TKI	Tyrozín kinázové inhibitory
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
UPD	Uniparentální dizomie

1 Úvod

Leukémie je velmi heterogenní onemocnění postihující leukocyty a/nebo jejich prekurzory. V dětském věku je leukémie nejběžnějším typem malignity. Leukémie lze rozdělit do několika skupin na základě rychlosti progresu neléčeného onemocnění (akutní vs. chronické) a postižení konkrétní leukocytární vývojové řady (lymfoidní vs. myeloidní). V dětském věku jsou častější leukémie akutní, u starších dospělých převažují leukémie chronické.

Dětská akutní lymfoblastická leukémie (ALL) se dále dělí do několika subtypů, jež jsou definovány např. postižením konkrétních buněčných typů (B- nebo T- lymfocytů a jejich prekurzorů) nebo přítomností chromozomální (strukturní či numerické) či genetické aberace. S různými geneticky definovanými subtypy se mimo jiné pojí rozdílná prognóza (viz Obrázek 1) a v některých případech i léčba. Mezi subtypy s nejhorší celkovou prognózou patří akutní lymfoblastická leukémie s fúzním genem *BCR-ABL1*.



Obrázek 1 Prognóza dětských pacientů s ALL v závislosti na subtypu leukémie

Pravděpodobnost přežití u dětských pacientů (n = 528), kteří byli v České republice diagnostikováni s ALL v letech 2002 – 2010. Převzato a upraveno dle Zuna and Zaliouva 2015.

2 Přehled literatury

2.1 *BCR-ABL1* pozitivní leukémie

Chromozomální aberace vedoucí k fúzi genů *BCR* (*Breakpoint cluster region*) a *ABL1* (homolog Abelsonova viru myši leukémie) je spojována především s chronickou myeloidní a akutní lymfoblastickou leukémií. Zatímco všichni pacienti s chronickou myeloidní leukémií (CML) nesou v maligních buňkách fúzní gen *BCR-ABL1*, jen část pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií má v leukemických buňkách tento typ aberace.

2.1.1 Fúzní gen *BCR-ABL1*

Fúzní gen *BCR-ABL1* vzniká zpravidla reciprokou translokací mezi chromozomy 9 a 22. Derivovaný chromosom 22 s výslednou aberací t(9;22)(q34;q11) je na chromozomální úrovni označován jako tzv. Philadelphský chromosom. Transkripce a následnou translaci fúzního genu vzniká konstitutivně aktivovaná tyrozin kináza, která mimo jiné dále aktivuje signalizační dráhy AKT-MYC či JAK-STAT. Ve svém důsledku vede tato signalizace k nekontrolovanému dělení, nezávislosti na růstových faktorech a redukcii apoptózy (Quintas-Cardama and Cortes 2009).

Zlomy v genu *BCR* vznikají nejčastěji ve dvou oblastech – v oblasti minor (~ 55 kbp, mezi exony 1 a 2; vzniká tak fúzní protein p190) a Major (~ 2,9 kbp, mezi exony 13 až 15; výsledná fúze kóduje protein p210), vzácně i v oblasti μ -*BCR* (~ 1 kbp, mezi exony 19 a 20) (Pane et al. 1996, Melo 1996). Na devátém chromozomu je zlomová oblast rozsáhlejší – nejčastěji zlomy vznikají mezi exony 1a a 3 genu *ABL1* (~ 150 kbp), avšak v některých případech ke zlomům dochází i před genem *ABL1* (Score et al. 2010, Burmeister et al. 2011).

Studie zahrnující větší množství pacientů ukazují, že rozložení zlomů v oblasti Major *BCR* není náhodné a má bimodální charakter (Krumbholz et al. 2019). Naproti tomu v oblasti genu *ABL1*, ve které k translokacím dochází, jsou zlomy distribuovány spíše náhodně (Ross et al. 2013, Krumbholz et al. 2019). Publikované práce navíc ukázaly možné rozdílné rozložení zlomů v oblasti Major *BCR* v závislosti na věku pacientů (děti vs. dospělí) (Krumbholz et al. 2012) či pohlaví (Krumbholz et al. 2019). Rozdíl v distribuci konkrétních

pozic zlomů v závislosti na typu diagnózy (ALL vs. CML) či typu fúzního genu (Major vs. minor, analýza genu *ABL1*) nebyl nalezen (Score et al. 2010, Burmeister et al. 2011).

Detailní analýzy přechodových sekvencí dosud nevedly k objasnění příčiny vzniku *BCR-ABL1* translokace. Za jednu z možných příčin byla považována přítomnost rozptýlených repetice – konkrétně Alu elementů – v blízkosti míst zlomů (Zhang et al. 1995) či aktivita RAG rekombináz (Score et al. 2010). Při analýze většího počtu pacientů se však tento předpoklad nepotvrdil. Nebyla prokázána ani spojitost mezi konkrétními pozicemi zlomů a přítomností DNA motivů, které jsou např. rozpoznávány některým typem topoizomeráz či hrají roli při přestavbách imunoglobulinů (Ross et al. 2013, Krumbholz et al. 2019). Nicméně na základě přítomnosti mikrohomologií a inzercí v přechodových sekvencích se zdá, že ke spojení obou fúzních partnerů dochází nehomologním spojováním konců (NHEJ, *non-homologous end-joining*) (Mattarucchi et al. 2008, Burmeister et al. 2011, Ross et al. 2013).

V rámci dosud publikovaných studií, které se věnují analýze fúzních sekvencí, byli vyšetřováni pouze pacienti s Major typem *BCR-ABL1* přestavby; jedinou výjimkou je práce Score et al. (Score et al. 2010). Podrobný popis fúzních sekvencí minor *BCR-ABL1* nebyl dosud publikován, v naší práci jsme se tedy mimo jiné zaměřili i na tento typ analýzy. Práce zabývající se charakterizací genomických přechodů *BCR-ABL1* jsou uvedeny níže (viz Tabulka 1).

Tabulka 1 Seznam publikací zaměřených na detekci a analýzu fúzních sekvencí BCR-ABL1

Publikace	Počet CML pacientů s Major BCR-ABL1 přestavbou	Počet ALL pacientů s Major BCR-ABL1 přestavbou	Počet ALL pacientů s minor BCR-ABL1 přestavbou
Bartley et al. 2010a	91		
Burmeister et al. 2011	32	38	
Fioretos et al. 1993	133		
Jeffs et al. 1998	4		
Krumbholz et al. 2012	59		
Krumbholz et al. 2019	178		
Mattarucchi et al. 2008	29		
Ross et al. 2013	308		
Score et al. 2010	32	25	25
Shibata et al. 2010	2		
Sowerby et al. 1993	5		
Thorsen et al. 2011	4		
Waller et al. 1999	22		
Zhang et al. 1995	14		

2.1.2 Chronická myeloidní leukémie

Nejčastějším onemocněním, které je spojováno s fúzním genem *BCR-ABL1*, je chronická myeloidní leukémie. Toto onemocnění je diagnostikováno především ve vyšším věku (An et al. 2010), u dětí je CML poměrně vzácná – v České republice se jedná o 1 – 2 případy ročně. Všichni pacienti diagnostikovaní s CML mají v leukemických buňkách přítomen fúzní gen *BCR-ABL1*, téměř vždy se jedná o Major formu *BCR-ABL1* přestavby, pouze výjimečně dochází u pacientů s CML k minor formě translokace (Verma et al. 2009).

Pacienti s chronickou myeloidní leukémií jsou léčeni především dlouhodobým podáváním tyrozin kinázových inhibitorů (TKI). Dospělým pacientům s CML jsou TKI podávány kontinuálně, avšak s ohledem na nežádoucí účinky dlouhodobého podávání tohoto typu chemoterapie probíhá v současné době několik studií, které jsou zaměřeny na bezpečné vysazení TKI léčby (Rea et al. 2017, Saussele et al. 2018, Clark et al. 2019). Střídaté podávání chemoterapie či úplné vysazení léčby je zvažováno pouze u pacientů, kteří se dlouhodobě nacházejí v remisi onemocnění. Největším problémem

po vysazení léčby TKI je však molekulární relaps onemocnění (Russo et al. 2015, Saussele et al. 2018). Vhodnější výběr pacientů, kterým je indikováno vysazení TKI léčby, by mohl snížit počet těch, u nichž k relapsu dojde. Současným standardem pro stanovení hloubky odpovědi na léčbu – a tedy i případné remise onemocnění – je u CML kvantifikace fúzního transkriptu Major *BCR-ABL1*. Retrospektivní analýzy ukazují, že citlivá detekce fúzního genu *BCR-ABL1* na DNA úrovni může odhalit perzistentní leukemické buňky s nedetekovatelnou úrovní transkripce *BCR-ABL1* (Bartley et al. 2015, Alikian et al. 2016, Rainero et al. 2018). Monitorování fúze na genomické úrovni by tedy v budoucnu mohlo zajistit spolehlivější výběr pacientů, kterým je léčba TKI vysazována. Přehled publikací zaměřených na stanovení hladiny leukemických buněk kvantifikací genomického přechodu *BCR-ABL1* viz Tabulka 2.

Tabulka 2 Seznam prací zaměřených na kvantifikaci fúzního genu *BCR-ABL1* na DNA úrovni

Publikace	Počet CML pacientů s Major BCR-ABL1 přestavbou	Počet ALL pacientů s minor BCR-ABL1 přestavbou
Alikian et al. 2016	32	
Bartley et al. 2010b	24	
Bartley et al. 2015	188	
Cumbo et al. 2018	10	
Krumbholz et al. 2019	178	
Pagani et al. 2014	8	
Pagani et al. 2018	59	
Porta et al. 2015	8	
Rainero et al. 2018	15	1
Ross et al. 2010	18	
Ross et al. 2018	26	
Sobrinho-Simoes et al. 2010	17	
Zhang et al. 1996	10	

Dětsí pacienti s CML byli až donedávna ve všech případech indikováni k transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT, *haematopoietic stem cell transplantation*). V současné době se však od tohoto schématu ustupuje, a to především z důvodu komplikací, které s sebou HSCT přináší (Suttorp et al. 2018). I dětským pacientům jsou tedy TKI

podávány kontinuálně a v současné době je připravována studie zaměřená na vysazení TKI léčby u dětských pacientů (Hijiya and Suttorp 2019). Zdá se tedy, že i dětské pacienti by mohli profitovat z citlivé detekce fúzního genu *BCR-ABL1* na genomické úrovni (Krumbholz et al. 2019).

Z biologického hlediska je CML myeloproliferativním onemocněním, které je nejčastěji diagnostikováno v průběhu chronické fáze. U části pacientů dochází k progresi onemocnění do fáze blastického zvratu (Cortes et al. 2006). Blastický zvrát je mimo jiné definován zvýšeným počtem blastů v kostní dřeni či periferní krvi pacienta. Ve většině případů dochází k myeloidnímu blastickému zvratu, avšak přibližně u čtvrtiny pacientů je blastickým zvratem postižena lymfoidní vývojová řada (Jain et al. 2017). U pacientů v lymfoidním blastickém zvratu mohou být v lymfoidních blastech detekovány delece postihující gen *IKZF1* (*Ikaros zink Finger 1*) (Nakayama et al. 1999, Grossmann et al.). V případě, že je pacient diagnostikován až ve fázi lymfoidního blastického zvratu – a to bez známé historie chronické fáze – je velmi obtížné, spíše nemožné, klinicky tento stav odlišit od *BCR-ABL1*-pozitivní akutní lymfoblastické leukémie, neboť klinický obraz a dominující populace nezralých lymfoblastů jsou u obou onemocnění stejné.

2.1.3 *BCR-ABL1*-pozitivní akutní lymfoblastická leukémie

Akutní lymfoblastická leukémie s fúzním genem *BCR-ABL1* tvoří 3 – 5 % všech ALL diagnostikovaných u dětí (Mullighan 2012). V České republice jsou s tímto onemocněním ročně diagnostikovány 1 – 2 děti. Většina dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL nese v leukemických buňkách minor formu fúzního genu (Biondi et al. 2018). Kromě přítomnosti chromozomální aberace jsou pro tento typ leukémie charakteristické delece genu *IKZF1* – až 65 % pacientů nese v leukemických buňkách některý typ delece, které tento gen postihují (Martinelli et al. 2009, van der Veer et al. 2014).

Děti s *BCR-ABL1*-pozitivní leukémií jsou v České republice léčeny podle rozsáhlého mezinárodního léčebného protokolu EsPhALL/COG (*European Intergroup Study on Post Induction Treatment of Philadelphia Positive Acute Lymphoblastic Leukaemia / Children's Oncology Group*), v rámci nějž jsou již standardně podávány tyrozin kinázové inhibitory. Zavedení TKI do léčebného protokolu pro dětské *BCR-ABL1*-pozitivní pacienty dramaticky

vylepšilo celkovou prognózu těchto pacientů (Arico et al. 2000, Biondi et al. 2012). I přes to však zůstává dětská *BCR-ABL1*-pozitivní ALL leukémií s jednou z nejhorších prognóz – pětileté přežití bez události dosahuje pouze 57 % a celkové přežití 5 let od diagnózy se pohybuje kolem 71 % (Biondi et al. 2018).

Současný léčebný protokol je rozdělen do dvou ramen s ohledem na možné riziko relapsu a celkovou prognózu onemocnění. Podle posledních výsledků se zdá, že by prognostický vliv mohla mít hladina leukocytů při diagnóze (Biondi et al. 2018). Stejně tak je za prognosticky významnou považována přítomnost delece genu *IKZF1* v leukemických buňkách, i když po zavedení TKI již pouze u pacientů s nízkým rizikem relapsu onemocnění (van der Veer et al. 2014). Nicméně ani jeden z těchto faktorů neslouží v rámci současného léčebného protokolu ke stratifikaci pacientů. Pacienti jsou do jednotlivých léčebných ramen stratifikováni na základě odpovědi na léčbu, která se určuje kvantifikací minimální reziduální nemoci (MRN; viz 2.3). Na základě hladiny MRN v konkrétním časovém bodě od počátku léčby jsou pacienti též indikováni k transplantaci hematopoetických kmenových buněk.

Jedním z největších problémů současné terapie dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL je vysoká toxicita léčby, která je zapříčiněna především vysokou kumulativní dávkou používaných chemoterapeutik (Biondi et al. 2018). Deintenzifikace léčby, která však nepovede k častějšímu výskytu relapsů, je tedy jedním z hlavních výzkumných cílů současného léčebného protokolu. Vysoká intenzita léčby dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL vyplývá především z historických zkušeností, neboť před zavedením TKI byli vzhledem ke špatné prognóze v rámci celé kohorty dětských ALL všichni tito pacienti zařazováni do skupiny s největším rizikem relapsu onemocnění.

Jak již bylo zmíněno výše, prognóza pacientů s ALL do značné míry závisí na primární genetické aberaci. Na opačném pólu než *BCR-ABL1*-pozitivní ALL se ve smyslu úspěšnosti léčby nachází vysoce hyperdiploidní ALL, charakterizovaná relativně nízkým počtem relapsů a celkově velmi dobrou prognózou.

2.2 Hyperdiploidní leukémie

Hyperdiploidní leukémie je definována zvýšeným počtem chromozomů (> 46) v leukemických buňkách a dále se dělí do dvou skupin na nížce (47 – 50 chromozomů) a vysoce (51 – 67 chromozomů) hyperdiploidní (Williams et al. 1982, Heerema et al. 2007). Vysoce hyperdiploidní leukémie (HHD, *high hyperdiploid*) je jedním z nejběžnějších subtypů dětské B-prekurzorové ALL, představuje 25 – 30 % všech případů (Moorman et al. 2003, Dastugue et al. 2013, Paulsson et al. 2013). Nejčastěji je tento typ ALL diagnostikován u dětí ve věku 2 – 5 let (Dastugue et al. 2013, Paulsson et al. 2013).

U pacientů s vysoce hyperdiploidní leukémií nedochází ke zmnožení jednotlivých chromozomů zcela náhodně. Zatímco chromozomy 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 a X bývají zmnoženy téměř u všech pacientů (Paulsson et al. 2013, Reismuller et al. 2017), chromozomy 5 a 8 jsou zmnoženy přibližně ve 40 % případů (Paulsson et al. 2010). Zbylé chromozomy se nacházejí ve zvýšeném počtu kopií jen u 10 – 20 % HHD pacientů (Heerema et al. 2007).

Ke vzniku hyperdiploidie pravděpodobně dochází v průběhu jednoho buněčného dělení, při němž nejsou sesterské chromatidy správně distribuovány do dceřiných buněk (Paulsson et al. 2005). Některé studie nicméně ukazují, že samotná hyperdiploidie nevede k rozvoji leukémie (Maia et al. 2003, Paulsson et al. 2015). K malignímu zvratu je důležitý tzv. druhý zásah, který však dosud není jednoznačně popsán. Mezi nejčastější sekundární aberace u pacientů s vysoce hyperdiploidní leukémií patří mutace v genech signální dráhy RAS (*KRAS*, *NRAS*, *FLT3*, *PTPN11*) a genu *CREBBP* (Paulsson et al. 2008, Malinowska-Ozdowy et al. 2015), dále se jedná o amplifikaci dlouhého raménka chromozomu 1 (Paulsson et al. 2013) a delece v genech *CDKN2A/2B*, *ETV6*, *PAX5* a *IKZF1* (Paulsson et al. 2010, Paulsson et al. 2015).

Diagnostika hyperdiploidních leukémií je závislá na přesné analýze buněčného karyotypu a to tradičně především pomocí klasické cytogenetiky a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Pomocí cytogenetické analýzy však není možné vždy přesně určit, které chromozomy jsou u pacienta zmnoženy. Zmnožení jednotlivých chromozomů, ale i necelochromozomové aberace, lze detekovat analýzou s použitím celogenomových SNP arrays (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Hyperdiploidii je možné detekovat i pomocí

průtokové cytometrie, a to stanovením DNA indexu (DNA_i). DNA_i vyjadřuje poměr množství DNA v leukemických buňkách a v nemaligních diploidních buňkách. Hodnota DNA_i však přesně neodráží počet zmnožených chromozomů, neboť velikost jednotlivých chromozomů – a tedy i množství DNA – je různá (např. chromozom 1 reprezentuje ~ 4 % z celkového genomu, zatímco chromozom 21 odpovídá přibližně 1 % celkové DNA). Hypoteticky se tedy hodnota DNA_i buňky s 51 chromozomy může pohybovat v rozmezí 1,05 – 1,2.

Nejčastěji se k diagnostice vysoce hyperdiploidních leukémií využívá cytogenetická analýza a/nebo stanovení DNA_i pomocí průtokové cytometrie. V případě druhé zmiňované metody je HHD ALL zpravidla diagnostikována při hodnotách DNA_i $\geq 1,16$. Tato hodnota DNA_i byla však historicky stanovena na základě studie, popisující u pacientů s touto hodnotou DNA_i významně lepší odpověď na léčbu (Look et al. 1985) a nezohledňuje cytogenetickou definici HHD ALL (> 50 chromozomů v leukemických buňkách). Studie zaměřené na vysoce hyperdiploidní leukémie tedy mohou ve výsledku analyzovat rozdílné skupiny pacientů s ohledem na použitou diagnostickou metodu. Některé novější studie potvrzují, že pacienti s DNA_i $\geq 1,16$ či s více než 53 chromozomy mají lepší prognózu než ti s nižším DNA_i (Moorman et al. 2003, Dastugue et al. 2013, Reismuller et al. 2017). Nicméně skupina hyperdiploidních pacientů s > 50 chromozomy a DNA_i $< 1,16$ je samostatně analyzována pouze výjimečně. V naší práci jsme se zaměřili na srovnání HHD pacientů s DNA indexem $< 1,16$ a $\geq 1,16$, a to jak z hlediska molekulárně-genetického, tak i z hlediska celkové odpovědi na léčbu.

Dětští pacienti s vysoce hyperdiploidní leukémií mají obecně velmi dobrou prognózu – pravděpodobnost pětiletého přežití bez události přesahuje 80 % a pravděpodobnost celkového přežití 5 let od diagnózy se pohybuje kolem 92 % (Reismuller et al. 2017). Někteří autoři spojují příznivou prognózu především s vyšším počtem zmnožených chromozomů či s konkrétními trizomiemi, a to i kombinovanými. Za prognosticky příznivé je považováno zmnožení chromozomů 4, 6, 10, 17, 18 či 22 (Moorman et al. 2003, Reismuller et al. 2017); pozitivní prognostický efekt podle některých autorů mají i kombinované trizomie chromozomů 4+10, 10+17, 10+18, 4+10+17 či 4+10+18 (Harris et al. 1992, Moorman et al. 2003, Dastugue et al. 2013, Paulsson et al. 2013,

Reismuller et al. 2017). Naproti tomu, trizomie chromozomu 5 se zdá být negativním prognostickým faktorem (Heerema et al. 2000).

Dětští pacienti s vysoce hyperdiploidní leukémií jsou v České republice léčeni podle mezinárodních léčebných protokolů pro léčbu dětských leukémií AIEOP-BFM ALL (*Associazione Italiana di Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Münster Acute Lymphoblastic Leukemia*). V rámci těchto léčebných protokolů jsou pacienti podle míry rizika relapsu onemocnění zařazeni do jednoho ze tří léčebných ramen s rozdílnou intenzitou léčby. V rámci současného protokolu AIEOP-BFM ALL 2017 již nejsou pro zařazení pacientů do jednotlivých léčebných ramen používány „klasické“ prognostické faktory (věk při diagnóze, leukocytóza) ani přítomnost konkrétní (kombinované) trizomie u pacientů s HHD ALL, jako je tomu v některých jiných léčebných protokolech (Hunger et al. 2013). Stratifikace pacientů probíhá na základě přítomnosti některých genetických aberací a zejména na základě časně odpovědi na léčbu, tedy podle hladin minimální reziduální nemoci v prvních měsících terapie.

2.3 Minimální reziduální nemoc

Hladina minimální reziduální nemoci je určena množstvím leukemických buněk v periferní krvi či kostní dřeni pacienta v průběhu léčby. Z technického hlediska lze MRN kvantifikovat několika způsoby, například cytogeneticky, pomocí průtokové cytometrie nebo kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*). Průběh minimální reziduální nemoci je při léčbě dětské ALL významným prognostickým faktorem. V rámci léčebného protokolu AIEOP-BFM ALL je odpověď na léčbu a hladina MRN stanovována v konkrétních časových bodech – v 8., 15. a 33. dnu, ve 12. týdnu od počátku léčby a někdy i dále, v závislosti na rizikové skupině. Na základě získaných hodnot jsou pacienti stratifikováni do jednotlivých léčebných ramen či indikováni k transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Léčebný protokol EsPhALL pro léčbu dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL vychází z protokolu BFM. Ke stanovení hladiny MRN se tedy využívají stejné časové body, nicméně ke stratifikaci pacientů a též k indikaci k transplantaci hematopoetických kmenových buněk slouží pouze výsledky naměřené ve 12. týdnu od počátku léčby.

U dětských ALL se pomocí molekulárně-genetického přístupu stanovuje hladina MRN kvantifikací klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny a/nebo T-buněčné receptory (Ig/TCR). U *BCR-ABL1*-pozitivní leukémie je možné měřit hodnoty MRN také kvantifikací exprese fúzního genu; přesto v rámci současného léčebného protokolu EsPhALL/COG slouží ke stratifikaci pacientů pouze výsledky získané kvantifikací přestaveb Ig/TCR. Již v minulosti však bylo u dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL provedeno porovnání obou molekulárně-genetických přístupů ke stanovení hladiny MRN (Ig/TCR vs. *BCR-ABL1* mRNA) a ukázalo nedostatečnou korelaci obou metod (Zaliova et al. 2009, Cazzaniga et al. 2018). V rámci těchto analýz mělo přibližně 20 % vzorků negativní hladiny MRN na úrovni přestaveb Ig/TCR, avšak fúzní transkript bylo možné v těchto vzorcích detekovat i na velmi vysoké úrovni.

Oba srovnávané přístupy se však opírají o detekci rozdílných nukleových kyselin, a to kromě rozdílů v technickém zpracování přináší i rozdíly biologické. Zatímco na genomické úrovni je v leukemické buňce vždy přítomna právě 1 kopie sledovaného cíle, hladina fúzního transkriptu se může měnit např. v závislosti na fázi buněčného cyklu či celkového buněčného vývoje i v závislosti na současně probíhající léčbě. Sledování hladin fúzního genu na RNA úrovni je využíváno především proto, že téměř u všech pacientů lze nalézt jeden ze dvou nejběžnějších fúzních transkriptů (minor nebo Major), zatímco na genomické úrovni jsou přechodové sekvence pro každého pacienta unikátní. Navíc ke zlomům v genech *BCR* a *ABL1* dochází v rozsáhlých intronových oblastech, a tak je nalezení konkrétního fúzního přechodu časově i technicky náročné. Nicméně abychom potvrdili rozdíly mezi hladinami MRN naměřenými kvantifikací přestaveb Ig/TCR a exprese fúzního genu *BCR-ABL1*, zavedli jsme metodu multiplex long distance PCR (LD-PCR) a následně i NGS Custom Target Enrichment (viz 4.5) k charakterizaci genomických přechodů fúze *BCR-ABL1* a následně jsme tyto sekvence využili pro kvantifikaci hladin MRN na DNA úrovni. Již v minulosti vzniklo několik rozsáhlých prací, které se věnovaly charakterizaci a kvantifikaci genomického fúzního přechodu Major *BCR-ABL1* u pacientů s CML (Bartley et al. 2015, Pagani et al. 2018, Krumbholz et al. 2019) - v rámci naší práce jsme se zaměřili na stanovení hladin fúzního genu u dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL.

3 Cíle práce

- Zavést spolehlivou metodu pro charakterizaci přechodové sekvence fúzního genu *BCR-ABL1* na genomické úrovni
- Provést analýzu fúzních sekvencí
- Kvantifikovat hladinu minimální reziduální nemoci u dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL s využitím přechodové sekvence fúzního genu na DNA úrovni a srovnat takto naměřené hodnoty s ostatními molekulárně-genetickými metodami, které se využívají ke stanovení hladiny minimální reziduální nemoci.
- Popsat klinické a biologické vlastnosti pacientů diagnostikovaných s vysoce hyperdiploidní leukémií a DNA indexem $< 1,16$

4 Metody a materiál

4.1 Skupiny pacientů, zpracování vzorků

Pro charakterizaci intronové přechodové sekvence fúzního genu *BCR-ABL1* byly celkem analyzovány vzorky od 491 pacienta: 220 dospělých pacientů s CML; 11 dospělých pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL; 4 dětských pacientů s CML; 39 dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL, které byly v České republice diagnostikovány v letech 1997 – 2019; a 217 dětí s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL diagnostikovaných v zahraničí (Austrálie, Německo, Izrael, Itálie). Dětské pacienty s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL byli léčeni podle několika různých léčebných protokolů, do kterých byla postupně začleňována léčba tyrozin-kinázovými inhibitory.

Kohorta pacientů s HHD ALL byla vybrána ze souboru dětských pacientů s ALL, kteří byli v České republice diagnostikováni mezi lety 2011 a 2014. Z celkového počtu 279 pacientů (všichni byli léčeni podle protokolu ALL BFM 2009) byl u 107 případů pomocí průtokové cytometrie zjištěn DNA index (DNAi) v rozmezí 1,0 – 1,6. Z tohoto souboru byl u 67 pacientů naměřen $\text{DNAi} \geq 1,16$, a proto byli tito pacienti klasifikováni jako hyperdiploidní leukémie. Pro analýzu pomocí SNP array byl k dispozici materiál od 51 pacienta. Ze souboru pacientů s $\text{DNAi} 1,0 - 1,16$ byl materiál dostupný u 35 pacientů (ze 40). U jednoho z těchto pacientů nebyla pomocí metody SNP array potvrzena hyperdiploidie (počet chromozomů v jeho leukemických blastech nepřesahoval 50 chromozomů). Celkem tedy bylo analyzováno 85 pacientů s HHD ALL. Žádný z pacientů, u kterých nebylo možné provést SNP array kvůli nedostatku materiálu, nebyl stratifikován do ramene protokolu pro pacienty s vysokým rizikem selhání léčby, výsledná skupina analyzovaných pacientů je tedy mírně obohacena o případy s vysokým rizikem relapsu onemocnění. Do výsledné kohorty byli navíc zařazeni 4 pacienti s HHD ALL ($\text{DNAi} > 1,0$ a > 50 chromozomů), kteří byli léčeni podle předchozího léčebného protokolu a u kterých byla dostupná data ze SNP array. Žádný z těchto čtyř pacientů nesplňoval kritéria pro zařazení do skupiny s vysokým rizikem relapsu onemocnění. V žádném ze zmíněných léčebných protokolů nebyla hyperdiploidie stratifikačním kritériem. Jako kontrolní skupina pro korelaci hladin DNAi naměřených pomocí průtokové cytometrie a SNP array sloužila skupina 54 pacientů, kteří nebyli

diagnostikování s hyperdiploidní leukémií. Do této skupiny byli vybíráni především ti s $DNA_i \neq 1,0$.

Od všech pacientů, jejichž materiál a data byly v této práci použity, byl předem získán informovaný souhlas.

Izolace mononukleárních buněk z kostní dřeně (KD) či periferní krve (PK) byla prováděna metodou gradientové separace pomocí Ficoll-Paque™ PLUS (Sigma-Aldrich). Získané pelety buněk byly zamrazeny a uloženy v -80°C (k následné izolaci nukleových kyselin) a/nebo byly vitální buňky zamrazeny v 10 % DMSO ve fetálním hovězím séru a uloženy do tekutého dusíku (s možností následného sortování buněk na jednotlivé populace).

4.2 Izolace nukleových kyselin, reverzní transkripce

RNA byla z buněk izolována metodou modifikované fenol-chloroformové extrakce (Phenol solution, Sigma-Aldrich), později pomocí TRIzol™ Reagent (ThermoFisher Scientific). K izolaci RNA z buněk po sortování byl použit RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen). Kvalita izolované RNA byla ověřována pomocí kapilární elektroforézy Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano, Agilent Technologies). Reverzní transkripce byla prováděna pomocí iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) a M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Množství přepsané cDNA bylo kvantifikováno pomocí stanovení exprese jednoho z genů pro *B2M*, *ABL1* či *GUSB* (Ipsogen ABL/GUS Control Gene Standards, Qiagen; Beillard et al. 2003).

S ohledem na množství buněk byl k izolaci DNA využit QIAamp DNA Mini či Micro Kit (Qiagen). DNA u malé části vzorků byla izolována pomocí BioRobot (EZ1® DNA Tissue Kit; Qiagen) nebo metodou vysolování (Miller 1988). V případě nedostatku zamražených buněčných pelet byla DNA izolována z fenolových fází (uchovaných po izolaci RNA fenolem či TRIzolem).

Koncentrace izolovaných nukleových kyselin byla následně stanovena pomocí UV spektrofotometru NanoDrop 1000. Pro přesnější stanovení množství DNA v konkrétním vzorku bylo využito kvantifikace genomické sekvence genu pro albumin (Human Genomic DNA, Sigma Aldrich).

4.3 Celogenomová amplifikace

V případě nedostatečného množství izolované DNA a malého množství zamraženého buněčného materiálu bylo využito metody celogenomové amplifikace (REPLI-g Mini Kit, QIAGEN) k získání většího množství DNA. Takto amplifikovaná DNA byla následně použita pouze pro hledání genomického přechodu fúzního genu *BCR-ABL1* a pro stanovení delece v genu *IKZF1*. Množství DNA ve vzorku po celogenomové amplifikaci bylo orientačně stanoveno pomocí kvantifikace genomické sekvence genu pro albumin.

4.4 Screening delecí v genu *IKZF1*

U pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní leukémií byly vyšetřeny čtyři typy delecí v genu *IKZF1*: delece mezi exony 2 a 7 ($\Delta 2-7$); 4 a 7 ($\Delta 4-7$); 2 a 8 ($\Delta 2-8$); 4 a 8 ($\Delta 4-8$). K nalezení těchto typů přestaveb byly využity již dříve publikované systémy (Venn et al. 2012, Caye et al. 2013) i nové primery a sonda (viz Příloha 1).

4.5 Stanovení genomického přechodu genu *BCR-ABL1*

Pro hledání přechodové sekvence fúzního genu *BCR-ABL1* na genomické úrovni byla využita metoda multiplex long-distance PCR (LD-PCR). Pro hledání zlomu u pacientů s minor *BCR-ABL1* přestavbou byly primárně použity 4 sady „forward“ primerů (každá po pěti primerech) na *BCR* straně a 4 sady reverzních primerů (každá po pěti primerech) na *ABL1* straně. U pacientů s negativním výsledkem prvního kola LD-PCR, byly využity ještě další čtyři sady reverzních primerů a jedna sada primerů na straně *BCR* (viz Příloha 1). Pozitivní reakce byly de-multiplexovány na *BCR* straně.

U pacientů s Major typem přestavby byly na *BCR* straně použity pouze tři primery, na *ABL1* straně byly použity stejné sady primerů jako v případě pacientů s minor typem přestavby. Většina primerů a jejich multiplexování byla přejata z literatury (Ross et al. 2010, Score et al. 2010, Krumbholz et al. 2012) (viz Příloha 1).

Produkty LD-PCR byly vizualizovány na 0,5% agarózovém gelu s GelRed Nucleic Acid Stain (LAB MARK). Produkty byly následně sekvenovány Sangerovou metodou *BCR* primerem použitým v PCR. Výsledné sekvence byly mapovány pomocí nástrojů BLAST (Altschul et al. 1990), ENSEMBL (Yates et al. 2016) či BLAT (University of California

Santa Cruz; (Kent 2002). V případě, že se při prvním sekvenování nepodařilo nalézt přechodovou sekvenci, byly v programu Vector NTI 8 Suite Software (ThermoFisher Scientific) navrženy další primery v genu *BCR* vzdálené několik set bází směrem k místu zlomu.

U několika pacientů nebylo ani opakované sekvenování Sangerovou metodou úspěšné, a tak bylo k nalezení přechodové sekvence využito platformy GS Junior (454 next-generation sequencing technology, Roche Diagnostics; Linhartova et al. 2015).

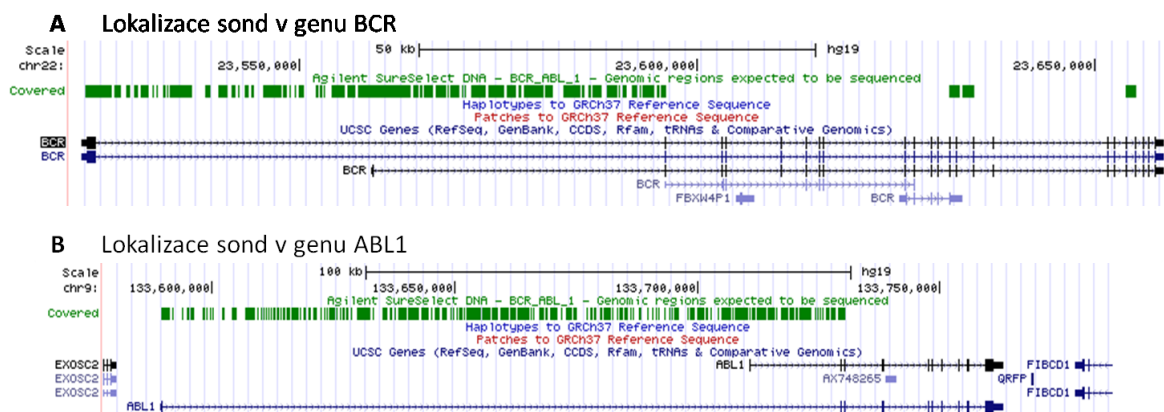
U pacientů s negativním výsledkem LD-PCR byla ověřena kvalita DNA pomocí kontrolního LD-PCR. V kontrolním LD-PCR byla amplifikována oblast genu *IKZF1* na chromozomu 7 (primery viz Tabulka 3).

Tabulka 3 Sekvence primerů použitých ke kontrolní LD-PCR

Název primeru	Sekvence	Délka produktu (kbp)
AR4 (reverse)	CTTCAGCCCATCACTGCTGCACTG	-
AR4 fow2b	GGTCACATTTCAAGTGCTCAGGAGTCAC	2
AR4 fow3	CATGCCAGGAAGCTGCCCTACCAAG	5
AR4 fow4b	GTTTCAGGCAGAAGACCAGCACGGTAG	10
AR4 fow5	GCATCACAGAATGGCCTTGAGGGTTAG	12

Na LD-PCR byly využity dva polymerázové systémy. Zpočátku byly produkty amplifikovány pomocí PCR Extender System (5 Prime), následně byla využívána výhradně AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Teplotní profil a složení jednotlivých reakcí jsou uvedeny v příloze (Příloha 1). Kratší produkty (≤ 1 kbp) bylo možné amplifikovat pomocí HotStarTaq polymerázy (Qiagen).

V současné době je k nalezení přechodové sekvenční vyžíván systém NGS Custom Target Enrichment (Agilent), který umožňuje cíleně sekvenovat vybranou oblast genomu. Pro analýzu přechodové sekvenční fúzního genu *BCR-ABL1* byly v obou genech vybrány oblasti vhodné pro cílené obohacení sekvenované DNA - celkem je v obou genech umístěno 1992 sond, které pokrývají 75,65 % z celkové sekvenční vybrané k mapování (Agilent NGS Custom Target Enrichment Probes, Agilent, viz Obrázek 2). K přípravě knihoven je využíván Agilent SureSelectQXT Reagent Kit (Agilent), sekvenování probíhá na přístroji NextSeq 550 (Illumina). K analýze sekvenčních dat jsou využívány nástroje STAR (Dobin et al. 2013) a deFuse (McPherson et al. 2011).



Obrázek 2 Mapování sond (zeleně) navržených pro NGS Custom Target Enrichment

(zdroj:UCSC Genome Browser)

4.6 Kvantifikace a vyhodnocování minimální reziduální nemoci

Detekce klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory (Ig/TCR) byla standardně prováděna pomocí PCR (van Dongen et al. 2003). V současné době se přestavby Ig/TCR detekují pomocí masivně paralelního sekvenování (Kotrova et al. 2015, Kotrova et al. 2017). Pomocí pacient-specifických systémů navržených na konkrétní diagnostickou přestavbu Ig/TCR lze následně pomocí qPCR stanovit hladinu MRN v odběru získaném v průběhu léčby. Návrh i optimalizace těchto systémů se řídí standardizovanými postupy (Verhagen et al. 2000, Langerak et al. 2001, van der Velden et al. 2002a, van der

Velden et al. 2002b). Vyhodnocování takto naměřených dat probíhá podle pravidel, která vydala Evropská skupina pro kvantifikaci MRN u pacientů s ALL (van der Velden et al. 2007). Tato pravidla se uplatňují při kvantifikaci MRN v rámci mezinárodních léčebných protokolů skupiny BFM již od roku 2000 a platí tedy i na současných protokolech AIEOP-BFM ALL 2017 (pro *BCR-ABL1*-negativní dětské ALL) a EsPhALL/COG (pro *BCR-ABL1*-pozitivní dětské ALL).

Pro kvantifikaci fúzního genu *BCR-ABL1* na genomické úrovni byly u každého pacienta navrženy primery tak, aby byla amplifikována přechodová oblast mezi oběma geny. Schéma reakcí qPCR odpovídalo schématu používanému při kvantifikaci přestaveb Ig/TCR. U některých pacientů bylo ke kvantifikaci MRN využito interkalační činidlo QuantiTect SYBR[®] Green (Qiagen). U zbylých pacientů byla ke kvantifikaci použita hydrolyzační sonda (FAM-TAMRA) optimálně navržená tak, aby mapovala na přechodovou sekvenci genů *BCR* a *ABL1*. Naměřená hladina MRN byla vyhodnocována podle stejných pravidel jako v případě kvantifikace přestaveb Ig/TCR.

Pro kvantifikaci buněk nesoucích delecii v genu *IKZF1* byly použity systémy uvedené v bodě 4.4 a následné vyhodnocování bylo taktéž provedeno dle výše zmiňovaných pravidel.

Stanovení exprese fúzního genu *BCR-ABL1* probíhalo na základě dříve publikovaných systémů (Gabert et al. 2003) s využitím komerčně dostupných standardů (Ipsogen BCR-ABL1 m/MBCR Kits, Qiagen). Exprese fúzního genu byla vždy vztažena k jednomu z housekeeping genů (*B2M*, *ABL1* či *GUSB* - viz bod 4.2).

Hladině MRN v diagnostickém (výjimečně v relapsovém) vzorku byla přiřazena hodnota 1,00. Pro výpočty a grafická znázornění byla vzorkům, u kterých nebyla detekována žádná hladina MRN, přiřazena číselná hodnota 5×10^{-7} . Vzorky s nízkou hladinou MRN, které nesplnily kritéria pro přesnou kvantifikaci, byly slovně hodnoceny jako *pozitivní nekvantifikovatelné* a byla jim přiřazena číselná hodnota 1×10^{-5} .

4.7 Definice diskrepantních výsledků při stanovování hladiny MRN

V rámci této studie nás nejvíce zajímalo srovnání hladin MRN získaných kvantifikací Ig/TCR a *BCR-ABL1* na DNA úrovni. Vzorky, u kterých se hodnoty MRN získané oběma metodami pohybovaly v rozmezí jednoho řádu včetně, byly označeny

za *korelující/konkordantní*. Naproti tomu vzorky, u kterých se hladiny MRN lišily o více než jeden řád, byly označeny za *nekorelující/diskordantní*. Dalším kritériem hodnocení vzorků bylo kvantitativní rozmezí a citlivost konkrétního systému na stanovení hladiny MRN. V případě, že hladina MRN naměřená jednou z metod byla ≤ 1 řád nad kvantitativním rozmezím (senzitivitou) metody druhé a zároveň byl daný vzorek druhou metodou považován za *pozitivní nekvantifikovatelný* (negativní), byl tento označen jako *konkordantní*. Taktéž vzorek, který byl jednou metodou označen jako negativní a druhou metodou jako *pozitivní nekvantifikovatelný*, přičemž senzitivita druhé metody byla ≤ 1 řád vyšší než senzitivita metody první, byl označen jako *konkordantní*.

Pacienti s několika po sobě jdoucími vzorky/odběry, které byly označeny jako *diskordantní*, byli považováni za pacienty s nekorelujícím/diskordantním průběhem MRN. Ostatní pacienti byli označeni jako pacienti s korelujícím/konkordantním průběhem MRN.

4.8 Analýza přechodových sekvencí

Vizualizace a analýza přechodových sekvencí byla provedena v rozhraní R Studia (v0.98.1079) s použitím programu R (v3.5.2). K nalezení rozptýlených repetit (IR, *interspersed repeats*) v genech *BCR* a *ABL1* byl využit program RepeatMasker (v.4.0.7.; (Smit et al.). Pro identifikaci kryptických rekombinačních signálních sekvencí (RSS) byla využita RSS databáze (Merelli et al. 2010).

4.9 Sortování buněk a následná analýza

Vitální buňky (kostní dřeň či periferní krve) zamražené v DMSO (viz bod 4.1) byly použity k sortování jednotlivých buněčných populací na sklíčko. Primárně byly sortovány tyto populace: T-lymfocyty ($CD3^+$), myeloidní buňky ($CD33^+$), maligní B-buněčné prekurzory ($CD19^+CD10^+CD45^{dim}$) a nemaligní B-lymfocyty ($CD19^+CD10^-CD45^{++}$). V některých případech byly tyto populace rozlišovány ještě na základě doplňujících znaků, aby byla minimalizována pravděpodobnost kontaminace ostatních populací leukemickými blasty. U několika pacientů bylo možné sortovat i multipotentní progenitory ($CD34^+CD38^+CD19^-CD10^-$) a kmenové buňky ($CD34^+CD38^-CD133^+CD19^-CD10^-$).

Buňky byly na sklíčku fixovány modifikovaným fixačním činidlem HCl/Tween20 (Harper et al. 1995). K vizualizaci fúzního genu *BCR-ABL1* pomocí fluorescenční in-situ

hybridizace (FISH) byly použity sondy Dual Fusion LPH 007 probe (Cytocell) či Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (Abbott Molecular).

U některých pacientů byly buňky sortovány k následné izolaci DNA či RNA. U těchto vzorků byly změřeny hladiny MRN podle výše zmíněných přístupů.

4.10 Screening mutací u pacientů s hyperdiploidní leukémií

U pacientů s hyperdiploidní leukémií byly hledány mutace v genech *NRAS* a *KRAS* (kodony 8-16, 61), *FLT3* (kodony 572-623, 810-842), *PTPN11* (kodony 60-76, 502-210) a *CREBBP* (kodony 1259, 1278, 1371, 1408-1412, 1435-1450, 1476-1502, 1550-1576, 1680). Na screening mutací byly použity již dříve publikované systémy (Kiyoi et al. 1999, Christiansen et al. 2007, Paschka et al. 2013) i nově navržené primery (viz Příloha 2). Získané produkty byly následně sekvenovány Sangerovou metodou.

4.11 Hodnocení odpovědi na léčbu

Časná odpověď na léčbu byla sledována v konkrétních časových bodech a analyzována pomocí několika metod. V den +8 (D8) od počátku léčby je morfologicky vyhodnocována časná odpověď na léčbu prednisonem. Pomocí průtokového cytometru je analyzován vzorek odebraný v den +15 (D15) od počátku léčby. Na základě stanovení hladiny MRN kvantifikací přestaveb Ig/TCR jsou hodnoceny vzorky ze dne +33/týdnu +12 (D33/T12) od počátku léčby.

Pacienti se špatnou odpovědí na léčbu prednisonem (≥ 1000 leukemických blastů na μl v periferní krvi v D8), s hladinou MRN $\geq 10\%$ v D15 (průtoková cytometrie), hladinou MRN $> 10^{-3}$ v T12, nebo s hladinou MRN $> 10^{-3}$ v D33 v kombinaci s jakoukoliv pozitivitou v T12 byli označeni jako pacienti s vysokým rizikem relapsu onemocnění. Ostatní pacienti byli z pohledu odpovědi na léčbu označeni jako pacienti středního či nízkého rizika.

4.12 Expresní profilování a analýza dat

Expresní profilování bylo provedeno technologií microarrays (HumanHT-12 v4 Expression BeadChip; Illumina, USA). Takto získaná data byla nejdříve předběžně zpracována pomocí GenomeStudio software (Illumina), dále byla analyzována v rozhraní R Studia (v0.98.1079) s použitím R softwaru (v3.2.2). Na naměřených intenzitách byla

provedena korekce na pozadí, kvantilová normalizace a log₂ transformace. Pro hledání rozdílně exprimovaných genů mezi jednotlivými skupinami byl využit soubor funkcí limma (Linear Models for Microarray Data; Bioconductor v3.26.3). K vyloučení variability exprese, která mohla být způsobena použitím více microarray čipů, kitů různých šarží a pohlavím pacienta byl v rámci limma analýzy vytvořen lineární model $\sim 0 + \text{skupiny-k-porovnání} + \text{pohlaví} + \text{čip}$. Normalizovaná data byla korigována na základě limma modelu na pohlaví a čip. Takto korigovaná data byla následně použita k nesupervidovanému hierarchickému klastrování (euklidovská vzdálenost, klastrování na základě metody ward.D2), k Gene Set enrichment analýze (GSEA v2.1.0, MSigDB v5.0;(Subramanian et al. 2005) a k analýze kumulativní distribuce exprese (bioMart v2.24.1, ggplot2).

4.13 Stanovení DNA indexu a variability počtu kopií

K určení DNA indexu na průtokovém cytometru byl použit BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit (BD) dle návodu výrobce. Analýza naměřených výsledků byla provedena pomocí ModFit LT software (Verify Software House). Hodnota DNA_i byla vypočítána jako poměr průměrů množství aneuploidních a diploidních G0/1 frakcí.

Variabilita počtu kopií (CNV) určitých segmentů DNA byla analyzována pomocí SNP array (*Single nucleotide polymorphism*, Human Omni Express BeadChip, Illumina). Značení DNA a její hybridizace byly provedeny dle Infinum HD Ultra protokolu (Illumina). Kontrola kvality a genotypová analýza byly provedeny v GenomeStudio Software v2011.1 (Illumina). Oblasti uniparentální disomie (UPD) a CNV byly detekovány pomocí algoritmu CNV Partition 2.4.4 plug-in, který je součástí GenomeStudia. Oblasti, které byly označeny jako CNV či jako UPD, byly následně kontrolovány v Illumina Genome Browser. Na základě této kontroly byly některé souřadnice UPD či CNV manuálně upraveny. Delece, které odpovídaly somatickým přestavbám genů pro Ig/TCR, nebo ty, které byly detekovány i v remisních vzorcích, byly vyloučeny z další analýzy. K anotaci a následné vizualizaci dat bylo použito rozhraní R Studia (viz bod 4.12) a soubory funkcí dostupné v rámci projektu Bioconductor: GenomicRanges (v. 1.22.1), Gviz (v.1.14.0), hiAnnotator (v. 1.0.0), org.HS.eg.db (v. 3.0.0), TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene (v. 3.0.0), VariantAnnotation (v1.16.3). *Teoretický* DNA_i byl vypočítán jako poměr množství DNA

v dominantním klonu leukemických buněk a množství DNA ve zdravé diploidní buňce (s ohledem na pohlaví).

4.14 Statistická analýza

K porovnání metod pro kvantifikaci MRN byl použit Spearmanův korelační koeficient. Vzorky, které byly negativní pomocí obou srovnávaných metod, byly vyloučeny z korelační analýzy. Analýza distribuce zlomových oblastí byla provedena pomocí testu uniformity na základě Pearsonova chí-kvadrát testu. Srovnání množství bílých krvinek (leukocytóza) bylo provedeno pomocí dvoucestného ANOVA testu s ohledem na variantu fúzního genu *BCR-ABL1* (minor vs. Major). Srovnání skupin bylo provedeno pomocí Mann-Whitney U testu a testu Kruskal-Wallis.

K výpočtu korelace hodnot DNA_i (průtoková cytometrie vs. SNP array) byl použit Spearmanův korelační koeficient. Pravděpodobnost přežití bez události (EFS, *event free survival*) byla spočítána na základě délky doby od diagnózy do první události. Za událost bylo považováno: i) nedosažení kompletní remise (klasifikováno jako „událost v den 0“), ii) relaps, iii) sekundární malignita, iv) smrt. Kaplan-Meierův odhad byl použit k výpočtu pravděpodobnosti EFS. Ke srovnání EFS a celkového přežití mezi jednotlivými skupinami byl použit log-rank test.

Rozdíly v zastoupení daného jevu mezi jednotlivými skupinami byly hodnoceny pomocí Mann-Whitney nebo Fisherova exaktního testu.

5 Výsledky

Tato kapitola je rozdělena do dvou částí dle příslušných projektů se zaměřením na *BCR-ABL1*-pozitivní leukémie a vysoce hyperdiploidní leukémie. Podstatná část výsledků je uvedena v příložených publikacích, součástí této kapitoly jsou však i data a analýzy, které byly do projektů zařazeny později či nebyly součástí uvedených publikací.

5.1 Leukémie s fúzním genem *BCR-ABL1*

5.1.1 Počty pacientů

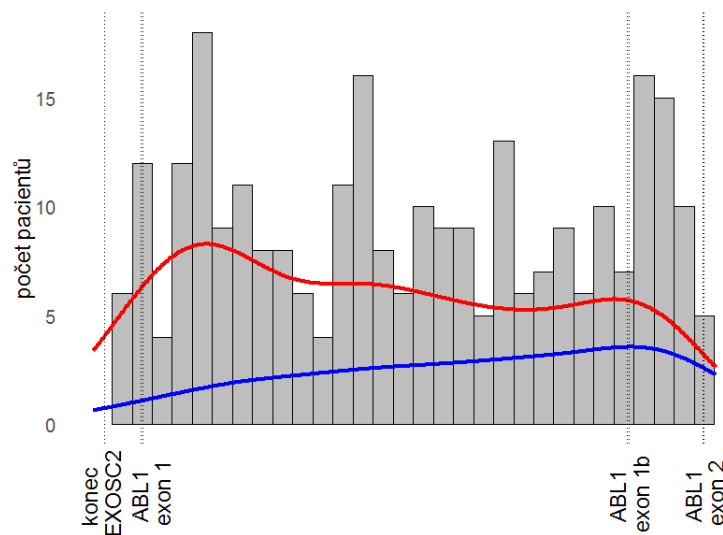
Celkem byla přechodová sekvence fúzního genu *BCR-ABL1* charakterizována u 428 z 491 (87 %) pacienta. U dospělých pacientů s CML byl zlom nalezen u 162/220 pacientů (74 %; všichni pacienti – s jednou výjimkou - nesli Major typ přestavby), u dospělých pacientů s ALL se zlom podařilo nalézt v 8 případech (73 %; Major: 7/10; minor: 1/1). U všech dětí s CML se zlom podařilo charakterizovat (Major 4/4). Ze všech dětských ALL se zlom podařilo nalézt u 254/256 pacientů (99 %; Major: 53/55; minor: 201/201).

Pomocí metody LD-PCR byl zlom nalezen u 257/344 pacientů (75 %; Major: 187/254; minor: 70/90). S využitím NGS Target Enrichment byl zlom charakterizován u 171/172 pacientů (99 %; Major: 39/39; minor: 132/133).

5.1.2 Analýza přechodových sekvencí

K pilotní analýze přechodových sekvencí byla použita data části námi osekvenovaných pacientů (272) a 12 dospělých CML pacientů s Major *BCR-ABL1* přechodem, jejichž fúzní sekvence byly získány pomocí NGS přístupu Nextera® Rapid Capture Custom Enrichment (Illumina) na Ústavu hematologie a krevní transfúze. Jednalo se o pacienty, u kterých se nám v minulosti nepodařilo přechodovou sekvenci charakterizovat pomocí LD-PCR. Výsledky sekvenování *BCR-ABL1* fúze u těchto 12 případů ukázaly na nedostatečné pokrytí části chromozomu 9 před genem *ABL1*.

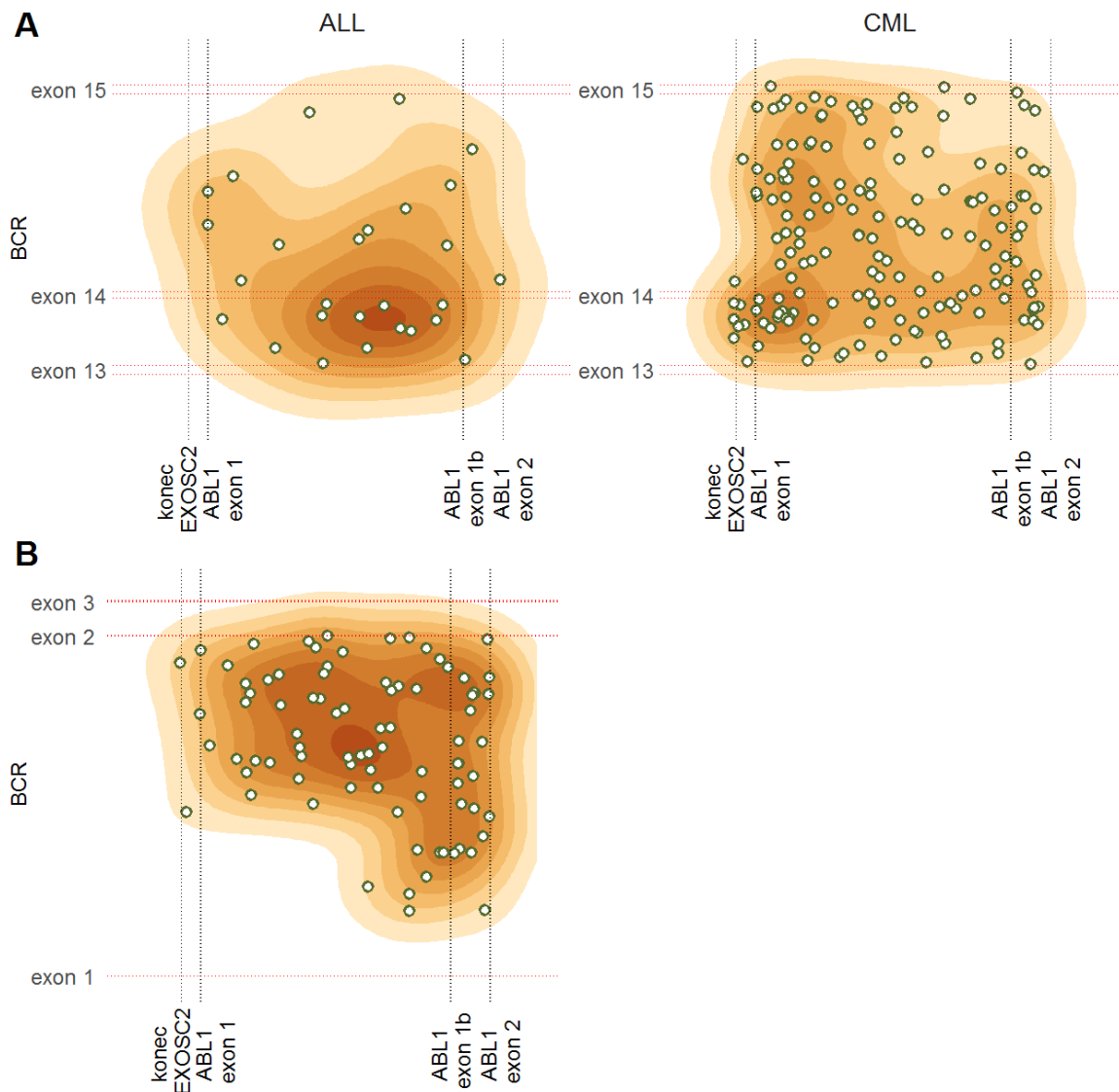
V rámci oblastí Major *BCR*, minor *BCR* a v intronu 1 genu *ABL1*, ve kterých dochází ke zlomům, klastrovací analýza neukázala konkrétní užší rozmezí, v němž by ke vzniku zlomů docházelo preferenčně. Test uniformní distribuce však ukázal, že oblasti zlomů v genu *BCR* nejsou rozmístěny zcela náhodně (Major $p < 10^{-4}$, minor $p = 0,009$ vs. *ABL1* $p = 0,22$). U pacientů s minor typem přestavby byly zlomy častější s rostoucí vzdáleností od *BCR* exonu 1. U pacientů s Major typem přestavby byl patrna bimodální distribuce zlomů s maximy na konci intronu 13 a uprostřed intronu 14. U sedmi a tří pacientů došlo ke zlomu v *BCR* exonu 14 respektive v exonu 15. V oblasti genu *ABL1* bylo rozložení konkrétních pozic zlomů signifikantně rozdílné v závislosti na typu přestavby (minor vs. Major $p = 0,008$), diagnóze (ALL vs. CML $p = 0,002$) a věku pacienta (děti vs. dospělí $p = 0,005$). Počty pacientů se zlomem v konkrétním úseku genu *ABL1* zobrazuje Obrázek 3.



Obrázek 3 Rozložení zlomů v oblasti genu *ABL1*

Zobrazení počtu pacientů se zlomem v konkrétním úseku genu *ABL1* (oblast genu *ABL1* je rozdělena na úseky á 5 kbp, šedě). Histogramem je proložen odhad hustoty pravděpodobnosti vzniku zlomu pro pacienty s Major (červeně) a minor (modře) typem přestavby.

V devíti případech (7x Major, 2x minor) byl zlom na chromozomu 9 lokalizován ještě před genem *ABL1*, u 5 pacientů (4x Major, 1x minor) došlo ke zlomu v genu *EXOSC2*, který leží bezprostředně (~ 9 kbp) před genem *ABL1*. U jednoho pacienta (minor) došlo ke zlomu v *ABL1* exonu 2. Celkové rozložení zlomových oblastí v genech *BCR* i *ABL1* znázorňuje Obrázek 4.



Obrázek 4 Pozice zlomů v genu *ABL1* a *BCR*

Konkrétní pozice zlomů u pacientů s Major (4A) a minor (4B) typem přestavby. Zobrazené heatmapy představují 2D odhad hustoty pravděpodobnosti výskytu zlomů v daných regionech.

V osmi případech (3 %; všechny s Major typem přestavby) nebyl charakterizován typický přechod *BCR-ABL1*. U pěti pacientů se jednalo o přechod *BCR*-inverze *ABL1-ABL1*. Délka invertované části genu *ABL1* se pohybovala v rozmezí 11 až několik set bp. Dalšími anomáliemi v přechodové sekvenci byly: *BCR*-inverze *BCR-ABL1* (205 bp); *BCR*-duplikace *ABL1-ABL1* (26 bp) a *BCR-ASIC2-ABL1* (4760 bp; gen *ASIC2* je lokalizován na chromozomu 17).

Krátký překryv sekvencí genů *BCR* a *ABL1* v místě zlomu (v rozsahu do 4 bp) byl přítomen u 116 pacientů (41 %; 85x Major, 31x minor) a u 117 pacientů (41 %; 78x Major, 39x minor) došlo ke spojení tupých konců. U dvou pacientů s minor typem přestavby došlo ke zlomu v dlouhé oblasti homologie (56 a 40 bp). Naproti tomu u 30 pacientů (11 %) byly mezi sekvence obou genů vloženy náhodné nukleotidy (rozsah 1 – 42 bp, medián = 2; 21x Major, 9x minor).

Blízká lokalizace (≤ 10 bp) rekombinační signální sekvence a místa zlomu byla na *BCR* straně detekována u 10 pacientů (7x Major, 3x minor) a na *ABL1* straně u 8 pacientů (6x Major, 2x minor). Pouze u jednoho pacienta (Major) byla RSS přítomna ve správné kombinaci (orientace, pravidlo 12/23) na obou vystřižených fragmentech genů *BCR* i *ABL1*.

Pomocí nástroje Repeatmasker byly získány úseky genů *BCR* i *ABL1*, které alespoň částečně mapují do některého ze sekvenčních motivů rozptýlených repetit. Celkové zastoupení IR úseků v části genu *ABL1*, Major *BCR* a minor *BCR* je 58, 25 a 41 % (viz Tabulka 4). Zastoupení jednotlivých skupin IR a množství pacientů, u kterých byly zlomy lokalizovány v místech IR, zobrazuje Tabulka 4. Pouze 21 pacientů (7 %) mělo zlomovou sekvenci lokalizovanou v či blízko (≤ 50 bp) stejné rodiny IR v obou fúzních partnerech (12 x Alu, 7 x LINE/L1, 1 x LINE/L2, 1 x jednoduchá repetice). U dvou pacientů se zlomem v Alu elementu byly v přechodové oblasti nalezeny úseky homologie (o délce 56 a 40 bp), které mapovaly jak do genu *BCR*, tak do genu *ABL1*. U pacienta s rozsáhlou inzercí části genu *ASIC2* do *BCR-ABL1* fúze, došlo ke zlomu v genech *BCR* a *ABL1* v Alu elementu, nicméně ve zlomových oblastech genu *ASIC2* nebyly tyto IR detekovány.

Tabulka 4 Podíl IR v genech *BCR* a *ABL1* a jejich lokalizace v oblastech zlomu

oblast	rozsah	Zastoupení IR v dané oblasti					celkem*
		Alu	fragmenty LINE/L1	fragmenty LINE/L2	LTR	ostatní ^Δ	
<i>BCR</i> (Major)	konec ex13 - konec ex15	9,88 %	7,56 %	6,66 %	0 %	0,73 %	24,83 %
<i>BCR</i> (minor)	konec ex1 - začátek ex2	17,38 %	10,39 %	0,65 %	10,63 %	5,84 %	40,72 %
<i>ABL1</i>	<i>EXOSC2</i> konec ex6 - <i>ABL1</i> začátek ex3	29,55 %	14,61 %	2,05 %	4,96 %	8,81 %	58,32 %

oblast	rozsah	Množství pacientů se zlomem v IR (v okolí ± 50 bp od IR) v %					celkem*
		Alu	fragmenty LINE/L1	fragmenty LINE/L2	LTR	ostatní ^Δ	
<i>BCR</i> (Major)	konec ex13 - konec ex15	9 (3)	9,5 (2,5)	3 (5)	0 (0)	0,5 (6,5)	22 (17)
<i>BCR</i> (minor)	konec ex1 - začátek ex2	15,5 (3,6)	8,3 (3,6)	1,2 (0)	9,5 (2,4)	3,6 (6,0)	38 (14,3)
<i>ABL1</i>	<i>EXOSC2</i> konec ex6 - <i>ABL1</i> začátek ex3	21,1 (11)	17,2 (9,8)	1,8 (2,5)	3,9 (1)	3,2 (4,6)	49,8 (26)

V oblasti Major/minor *BCR* bylo takto analyzováno 200 /84 pacientů, v oblasti *ABL1* bylo analyzováno 282 pacientů.

* Hodnota „celkem“ nemusí odpovídat součtu jednotlivých položek, neboť se IR mohou navzájem překrývat; a nebo může být zlom lokalizován v jednom typu IR a zároveň v blízkosti jiného typu IR.

^Δ Pojem „ostatní“ zahrnuje DNA elementy, jednoduché repetice, úseky s nízkou komplexitou (např. GA-bohaté oblasti) a retrotranspozony

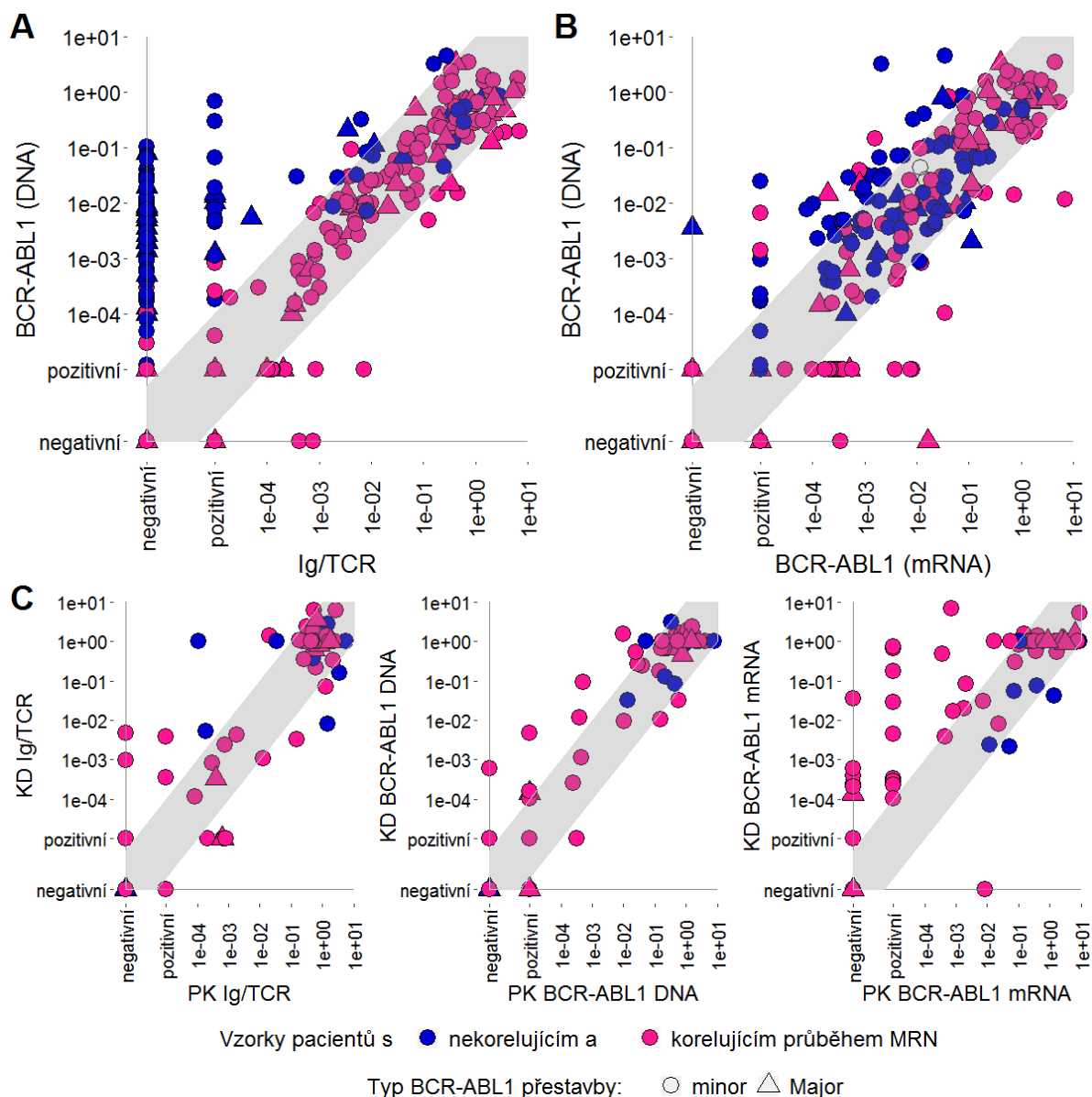
ex = exon

5.1.3 Celkové srovnání a průběh minimální reziduální nemoci

Hladina minimální reziduální nemoci na úrovni genomického přechodu *BCR-ABL1* byla stanovena u 55 dětských pacientů (13x Major, 42x minor) s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL. Celkem bylo tímto přístupem změřeno 592 vzorků kostní dřeně a 169 vzorků periferní krve (KD/PK Major:128/17; minor:464/152). U těchto vzorků byla hladina MRN současně kvantifikována také alespoň jednou z následujících metod – 1) kvantifikace Ig/TCR přestaveb: 558 vzorků KD a 157 vzorků PK; 2) exprese *BCR-ABL1*: 409 vzorků KD a 147 vzorků PK; 3) kvantifikace buněk s delecí v genu *IKZF1*: 180 vzorků KD. Dále byla hladina MRN stanovena u 34 vzorků KD od 3 dětských CML (kvantifikace genomického přechodu *BCR-ABL1* (34 vzorků), exprese *BCR-ABL1* (34 vzorků), kvantifikace Ig/TCR (33 vzorků) a kvantifikace delece *IKZF1* (14 vzorků)).

Senzitivity všech tří genomických metod byly srovnatelné a významně se nelišily (průměr = $4,5 \pm 0,1$ řád). Nicméně, kvantitativní rozmezí (QR, *quantitative range*) bylo signifikantně větší u *BCR-ABL1* přístupu ve srovnání s měřením přestaveb Ig/TCR ($p = 0,0006$, průměr/medián QR 4,1/4 vs. 3,7/4 řády pro *BCR-ABL1* vs. Ig/TCR).

Při analýze celkové korelace metod sloužících ke stanovení hladiny MRN jsme se zaměřili pouze na pacienty s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL. Z této analýzy byly vyloučeny vzorky, které byly negativní oběma porovnávanými metodami. Srovnání metod založených na kvantifikaci Ig/TCR přestaveb a *BCR-ABL1* na genomické úrovni ukázalo Spearmanův korelační koeficient $\rho = 0,61$ (356 vzorků KD; 53 pacientů; viz Obrázek 5A). Varianta fúzního genu *BCR-ABL1* neměla vliv na hodnotu korelačního koeficientu – u pacientů s Major a minor typem přestavby bylo $\rho = 0,71$ respektive 0,59 (66 respektive 290 vzorků KD). Porovnání metod založených na kvantifikaci fúzního genu (mRNA vs. DNA) ukázalo velmi dobrou korelaci obou přístupů ($\rho = 0,85$; 257 vzorků KD; 35 pacientů; viz Obrázek 5B). Pomocí stanovení hladiny MRN v párových vzorcích KD a PK bylo možné ukázat vyšší citlivost detekce při kvantifikaci MRN v kostní dřeni a to pro všechny metody (viz Obrázek 5C).



Obrázek 5 Celkové srovnání hladin minimální reziduální nemoci

Korelace hladin MRN naměřených pomocí genomických metod (5A) a kvantifikací fúzního genu (5B). Množství vzorků (5A), které byly na úrovni přestaveb Ig/TCR negativní, avšak fúzní gen byl na genomické úrovni kvantifikovatelný, představovalo 21,6 % z celkového počtu 357 vzorků. Z této analýzy byly vyloučeny vzorky, které byly negativní oběma metodami.

Obrázek 5C nabízí srovnání hodnot MRN naměřených v kostní dřeni (KD) a periferní krvi (PK). Stanovení hladiny MRN u vzorků KD dosahovalo vyšší sensitivity bez ohledu na použitou metodu:

počet negativních vzorků pouze na úrovni PK: 10 (Ig/TCR) 7 (*BCR-ABL1* DNA) 10 (*BCR-ABL1* mRNA)

počet negativních vzorků pouze na úrovni KD: 2 (Ig/TCR) 3 (*BCR-ABL1* DNA) 1 (*BCR-ABL1* mRNA)

počet změřených vzorků: 75 (Ig/TCR) 69 (*BCR-ABL1* DNA) 76 (*BCR-ABL1* mRNA)

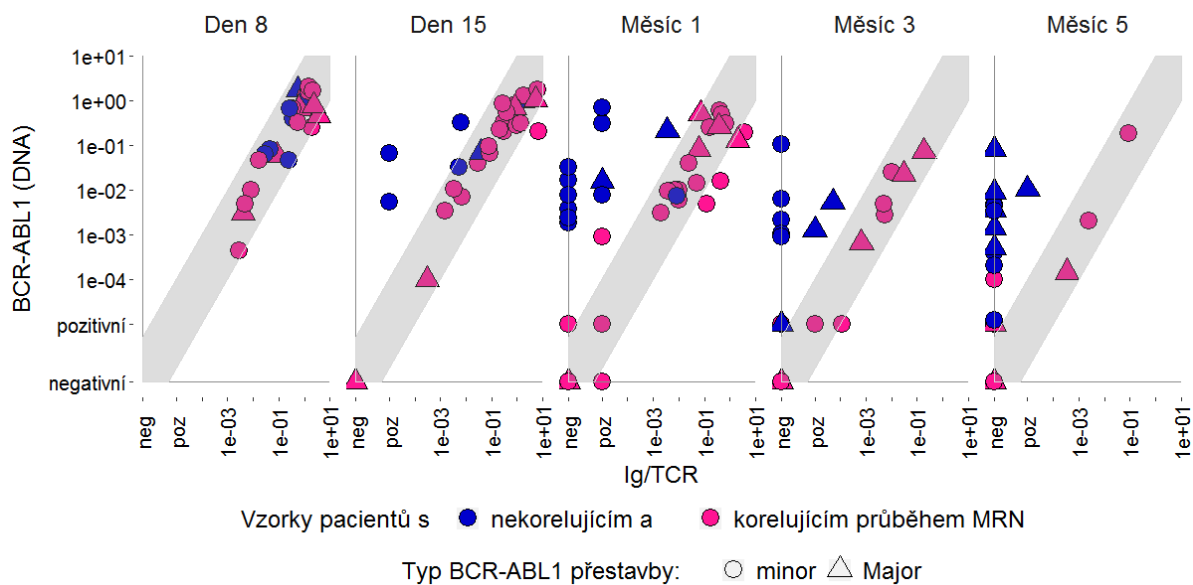
Šedý pás představuje oblast rozdílu do 1 řádu, včetně. Vzorky ležící v tomto rozmezí jsou považovány za korelující.

KD = kostní dřeň; PK = periferní krev

Celkově nízká korelace metod opírajících se o kvantifikaci fúzního genu *BCR-ABL1* a detekci Ig/TCR přestaveb byla způsobena především vyššími hodnotami MRN na úrovni genu *BCR-ABL1*. Srovnání genomických metod ukázalo 44 % vzorků s výrazně vyšší (> 1 řád) hladinou genu *BCR-ABL1* ve srovnání s Ig/TCR (zatímco řádově vyšší hladiny přestaveb Ig/TCR ve srovnání s genomickou hladinou *BCR-ABL1* byly naměřeny u 10 % vzorků). Podstatnou část špatně korelujících vzorků (21 %) tvořily ty, které byly na Ig/TCR úrovni negativní, avšak hladina MRN na úrovni fúzního genu byla kvantifikovatelná – a to i na vysokých hladinách. Rozložení vzorků s takto významně rozdílnými hodnotami nebylo mezi pacienty náhodné. Zatímco u většiny pacientů (35) koreloval celý průběh MRN velmi dobře, u některých pacientů (18) bylo detekováno několik po sobě jdoucích odběrů/vzorků s výrazně vyššími hodnotami MRN na úrovni *BCR-ABL1* DNA ve srovnání s přestavbami Ig/TCR. V rámci konsektivní kohorty 47 pacientů nebylo zastoupení pacientů s takto nekorelujícím průběhem MRN významně rozdílné v závislosti na typu přestavby (Major: 2/9; minor: 10/38).

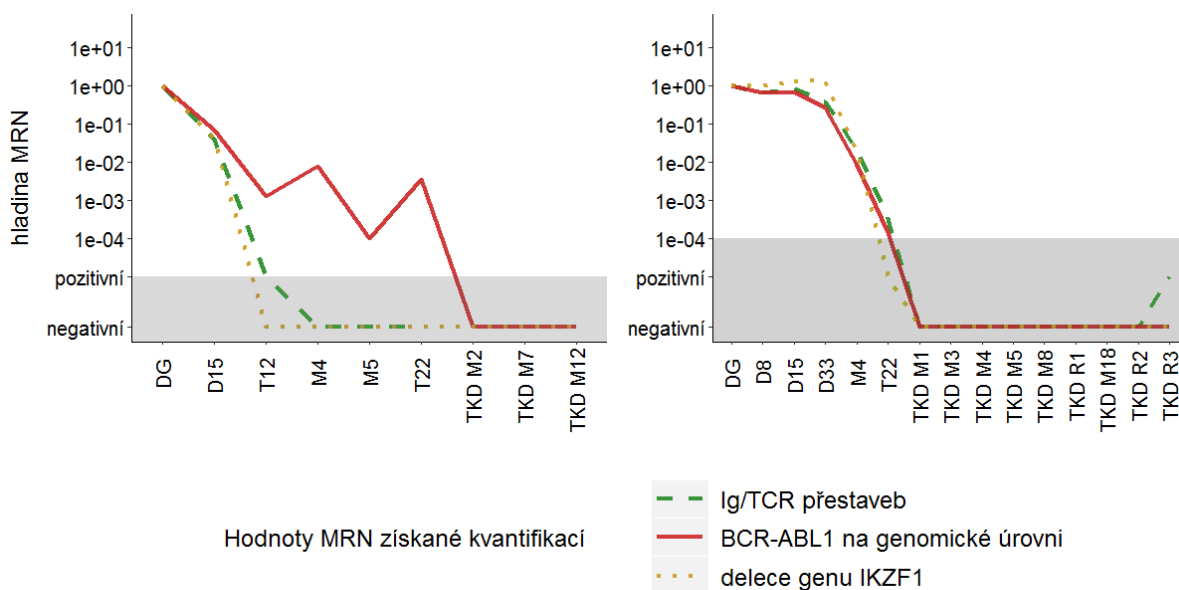
U pacientů s korelujícím průběhem MRN byly nekorelující vzorky velmi vzácné (13/420 tj. ~ 3 %; po odečtení vzorků, které byly negativní oběma metodami (149), se jednalo o 4,7 %) a vyskytovaly se ojediněle, přičemž rozdíly hladin MRN byly vždy v rozmezí dvou řádů, což svědčí spíše pro technické důvody nekorelace než pro biologické. Naproti tomu, u pacientů s nekorelujícím průběhem MRN byla u 50 % vzorků (83/167; po odečtení vzorků, které byly negativní oběma metodami (27) se jednalo o 60 %) hladina *BCR-ABL1* MRN alespoň o 1 řád vyšší než hodnota Ig/TCR MRN, rozdíly větší než 2 řády (*BCR-ABL1* > Ig/TCR) byly naměřeny u 22 % (37/167) vzorků.

Při analýze vzorků pacientů s diskordantním průběhem MRN byl v průběhu intenzivní terapie nalezen trend ve smyslu zvyšujícího se počtu diskordantních vzorků s narůstajícím časem od diagnózy. Zatímco po prvním týdnu léčby (D8) neměl žádný z pacientů nekorelující hladiny MRN (0/23), na konci druhého týdne (D15) byly vyšší hladiny *BCR-ABL1* naměřeny u 10 % pacientů (3/29) a po uplynutí 1, 3 a 5 měsíců byly vyšší hladiny fúzního genu naměřeny u 32 %, 40 %, respektive u 63 % pacientů (13/41, 10/25 a 19/30; viz Obrázek 6).



Obrázek 6 Srovnání hladin minimální reziduální nemoci v průběhu léčby

Dalším přístupem ke stanovení hladiny MRN byla kvantifikace buněk nesoucích delecii v genu *IKZF1*. Zatímco u pacientů s korelujícím průběhem MRN odpovídal průběh MRN naměřený tímto přístupem zbylým genomickým metodám (*BCR-ABL1* i Ig/TCR), u pacientů s diskordantním průběhem MRN odpovídalo množství buněk nesoucích delecii *IKZF1* počtu buněk s klonálními Ig/TCR přestavbami. Ilustrativní průběh MRN u pacientů s korelujícím a nekorelujícím průběhem MRN zobrazuje Obrázek 7, průběh MRN u většiny pacientů je uveden v příloze (Příloha 1).



Obrázek 7 Průběh minimální reziduální nemoci u pacienta s nekorelujícími a korelujícími hladinami MRN

DG = diagnóza; D = den; T = týden; M = měsíc; TKD = transplantace kostní dřeně

5.1.4 Přítomnost genu *BCR-ABL1* ve vybraných buněčných subpopulacích

U dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL, kteří byli v České republice diagnostikováni s primární manifestací či relapsem onemocnění v období od června 2007 do prosince 2014, byla analyzována přítomnost fúzního genu ve vybraných buněčných subpopulacích a hematopoetických prekurzorech. Celkem bylo takto analyzováno 12 konsekutivně diagnostikovaných pacientů, pouze jeden pacient byl z této kohorty vyloučen pro nedostatek materiálu. U dvou pacientů nebylo možné určit typ průběhu MRN (ne/korelující) na základě srovnání Ig/TCR a *BCR-ABL1* přístupu: u jednoho pacienta nebyla nalezena přechodová sekvence *BCR-ABL1* na DNA úrovni, u druhého nebyla nalezena klonální Ig/TCR přestavba vhodná ke kvantifikaci MRN. V těchto případech byly ke korelaci použity hladiny MRN naměřené pomocí exprese *BCR-ABL1* respektive průtokové cytometrie. Přítomnost fúzního genu v různých buněčných populacích bylo dále možné stanovit u 1 pacienta s korelujícím průběhem MRN. Výsledná kohorta byla tedy

složena z 9 pacientů s korelujícím průběhem MRN a 4 pacientů s diskordantním průběhem MRN. Kontrolní skupinu tvořili 3 dětští pacienti s CML.

Sortování na jednotlivé buněčné populace (leukemické blasty, T-lymfocyty, nemaligní B-lymfocyty a myeloidní buňky) s následnou FISH analýzou bylo provedeno u 12 diagnostických vzorků (10x *BCR-ABL1*-pozitivní ALL, 2x CML). Ze zbylých pacientů (1x CML a 3x *BCR-ABL1*-pozitivní ALL) byl jeden již dříve publikován (Zaliova et al. 2009) a u zbývajících byly jednotlivé buněčné populace z diagnostického/relapsového vzorku analyzovány pomocí qPCR (*BCR-ABL1* a Ig/TCR).

U sedmi pacientů s korelujícím průběhem MRN byl fúzní gen detekován pouze v leukemických blastech (v rozmezí 93 – 100 %), zatímco T-lymfocyty, nemaligní B-lymfocyty a myeloidní buňky byly negativní (< 2 % *BCR-ABL1*-pozitivních buněk; viz Obrázek 8A). Zbývajících dva pacienti s korelujícím průběhem MRN byli diagnostikováni s ALL, avšak při diagnóze u nich byla zaznamenána aberantní exprese myeloidního znaku CD33. Jeden z těchto pacientů měl tento znak při diagnóze na 40 % leukemických blastů, při relapsu onemocnění byly již všechny leukemické buňky CD33-pozitivní. Druhý pacient byl diagnostikován s bilineální B/myelo leukémií. U těchto 2 případů byl fúzní gen detekován také v myeloidních buňkách (sortovaných na základě CD33 positivity), T-lymfocyty i nemaligní B-buňky byly negativní. Následná analýza pomocí qPCR u těchto dvou pacientů potvrdila v CD33-pozitivních buňkách přítomnost nejen fúzního genu *BCR-ABL1*, ale i Ig/TCR přestaveb.

U pacientů s diskordantním průběhem MRN byl fúzní gen detekován nejen v leukemických blastech, ale i v T-lymfocytech (12 – 21 %), v nemaligních B-lymfocytech (15 – 83 %) a v myeloidních buňkách (15 – 80 %; viz Obrázek 8B). U dvou pacientů bylo možné potvrdit přítomnost fúzního genu v rozdílných buněčných typech i pomocí qPCR. Zatímco přestavba *BCR-ABL1* byla spolehlivě detekována ve všech vyšetřených buněčných populacích, Ig/TCR přestavby bylo možné kvantifikovat pouze v leukemických blastech. Ostatní buněčné typy byly na Ig/TCR úrovni negativní nebo nízce pozitivní (do 5 %), což odpovídá hladině možné kontaminace sortu.

Multipotentní progenitory a kmenové buňky byly analyzovány u dvou pacientů s korelujícím průběhem MRN a dvou pacientů s nekorelujícím průběhem MRN.

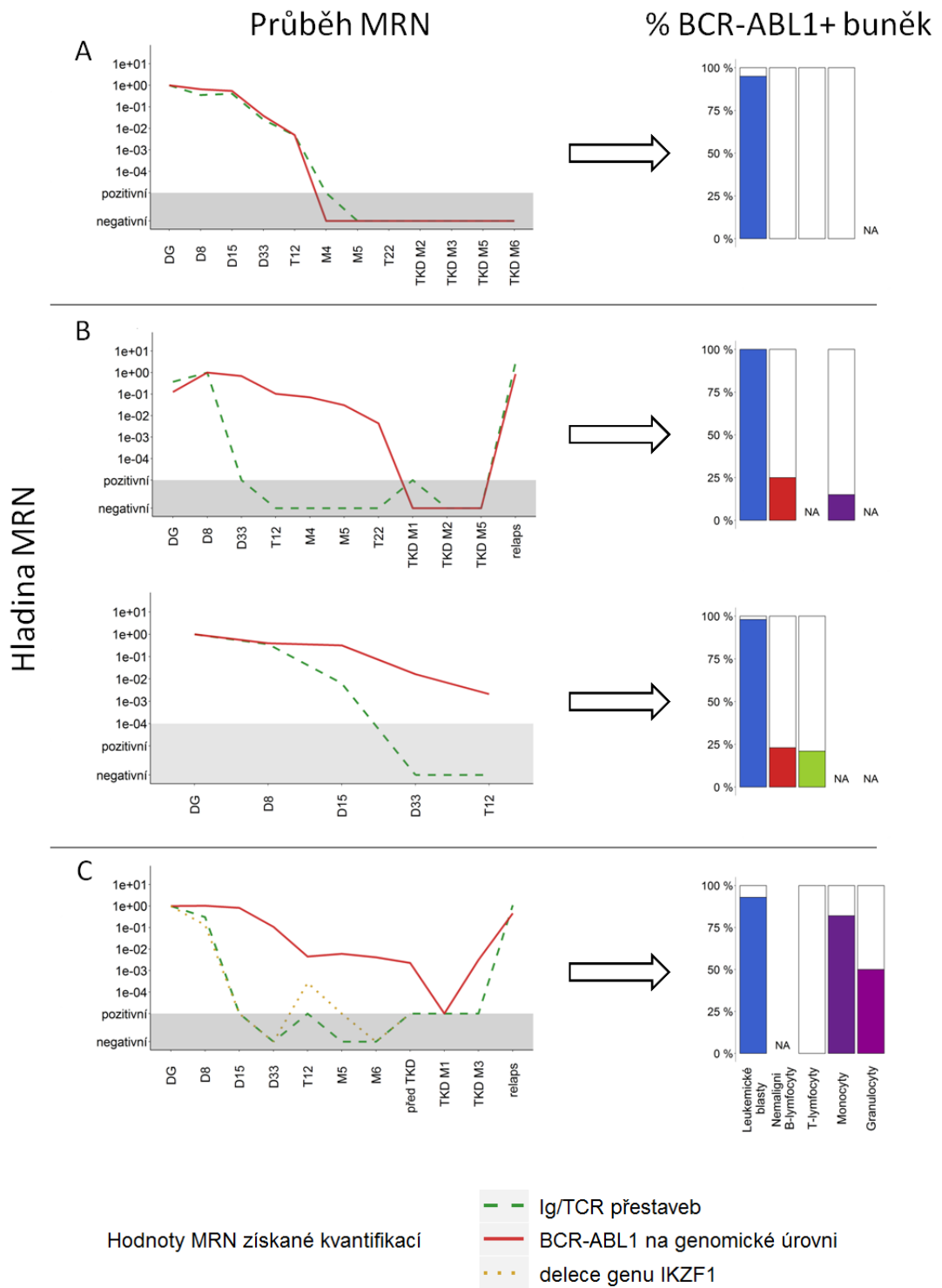
Ani v jednom případě se nám však nepodařilo spolehlivě potvrdit přítomnost fúzního genu *BCR-ABL1* v sortovaných populacích (viz Příloha 1).

U pacientů s CML (2 byli v chronické fázi, 1 ve fázi lymfoidní blastické krize) byl fúzní gen *BCR-ABL1* detekován v lymfoidních blastech (93 – 100 %), v monocytech (34 – 100 %) a v granulocytech (34 – 100 %; viz Obrázek 8C). Naproti tomu, v T-lymfocytech nebyl fúzní gen nalezen ani u jednoho z pacientů. U dvou pacientů bylo možné analyzovat i multipotentní progenitory a kmenové buňky. V obou případech byl fúzní gen *BCR-ABL1* přítomen ve všech analyzovaných buňkách obou buněčných typů (viz Příloha 1)

5.1.5 Leukocytóza a variabilita exprese *BCR-ABL1* při diagnóze

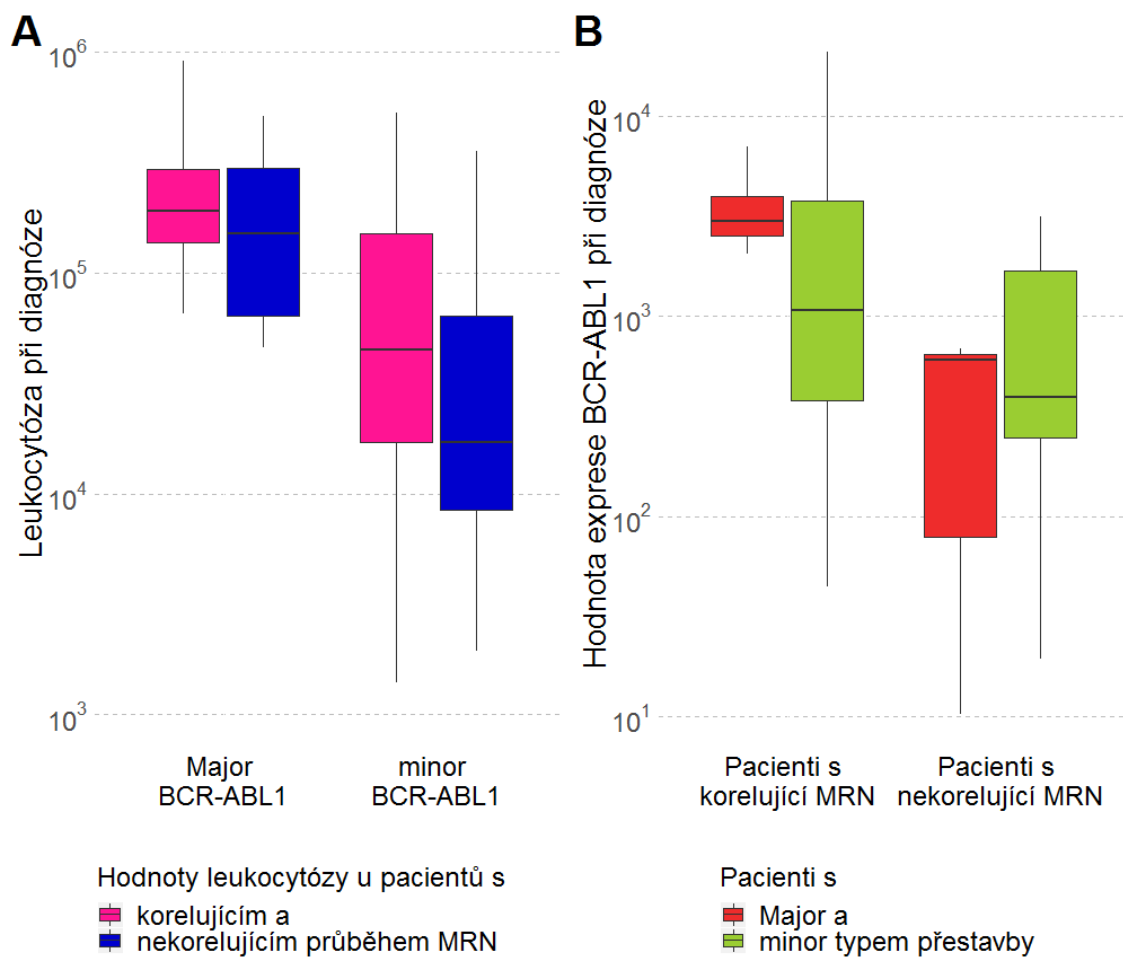
Celkové srovnání hladiny leukocytů při diagnóze bylo provedeno u dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL. Pacienti s Major typem přestavby měli signifikantně vyšší leukocytózu než pacienti s minor typem *BCR-ABL1* fúze ($p = 0,001$, viz Obrázek 9A). Srovnání mezi pacienty s korelujícím a nekorelujícím průběhem MRN neukázalo signifikantní rozdíly v diagnostické hladině leukocytů ($p = 0,2$).

Míra exprese *BCR-ABL1* byla analyzována pouze u dětských pacientů, u kterých byla hladina exprese fúzního genu normalizována k expresi jednoho ze dvou housekeeping genů: *B2M* či *GUSB*. Mezi pacienty s Major typem přestavby přesahovala variabilita exprese fúzního genu při diagnóze 2 řády, mezi pacienty s minor *BCR-ABL1* fúzí byla tato variabilita ještě vyšší a dosahovala rozdílu o více než 3 řády. Varianta fúzního genu neměla vliv na míru exprese *BCR-ABL1* při diagnóze. Pacienti s nekorelujícím průběhem MRN měli signifikantně nižší expresi fúzního genu při diagnóze než pacienti s korelujícím průběhem MRN ($p = 0,039$; viz Obrázek 9B).



Obrázek 8 Srovnání dynamiky MRN a přítomnosti fúze *BCR-ABL1* v buněčných subpopulacích při diagnóze u pacientů s ALL s korelujícím (A) a nekorelujícím (B) průběhem MRN a u pacienta s CML (C)

DG = diagnóza, D = den, T = týden, M = měsíc, TKD = transplantace kostní dřeně

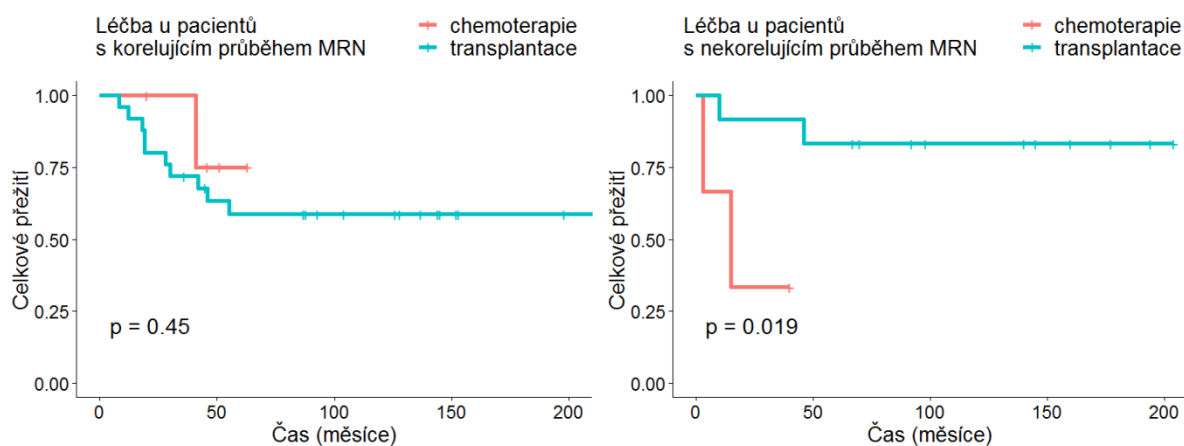


Obrázek 9 Srovnání hladiny leukocytů (A) a hodnoty exprese fúzního genu (B) u dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL

5.1.6 Analýza celkového přežití

Do analýzy celkového přežití byla zahrnuta pouze data dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL. Většina těchto pacientů podstoupila léčbu tyrozin kinázovými inhibitory (s výjimkou 3 případů; další 4 pacienti byli léčeni TKI až po relapsu onemocnění), i když schéma podávání bylo mezi pacienty různé (individuální léčba, rozdílné léčebné protokoly). Většina pacientů (80 %) též podstoupila transplantaci hematopoetických kmenových buněk.

Celkové přežití pacientů s korelujícím a nekorelujícím průběhem MRN nebylo rozdílné. V kohortě pacientů s korelujícím průběhem MRN nebyl nalezen rozdíl v přežití mezi pacienty, kteří podstoupili transplantaci kmenových buněk, a těmi, kteří byli léčeni pouze pomocí chemoterapie (viz Obrázek 10). Naproti tomu u pacientů s diskordantním průběhem MRN se celkově dařilo lépe transplantovaným pacientům (medián sledování ~ 10 let) ve srovnání s pacienty léčenými výhradně chemoterapií (viz Obrázek 10).



Obrázek 10 Vliv léčby na celkové přežití u dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL

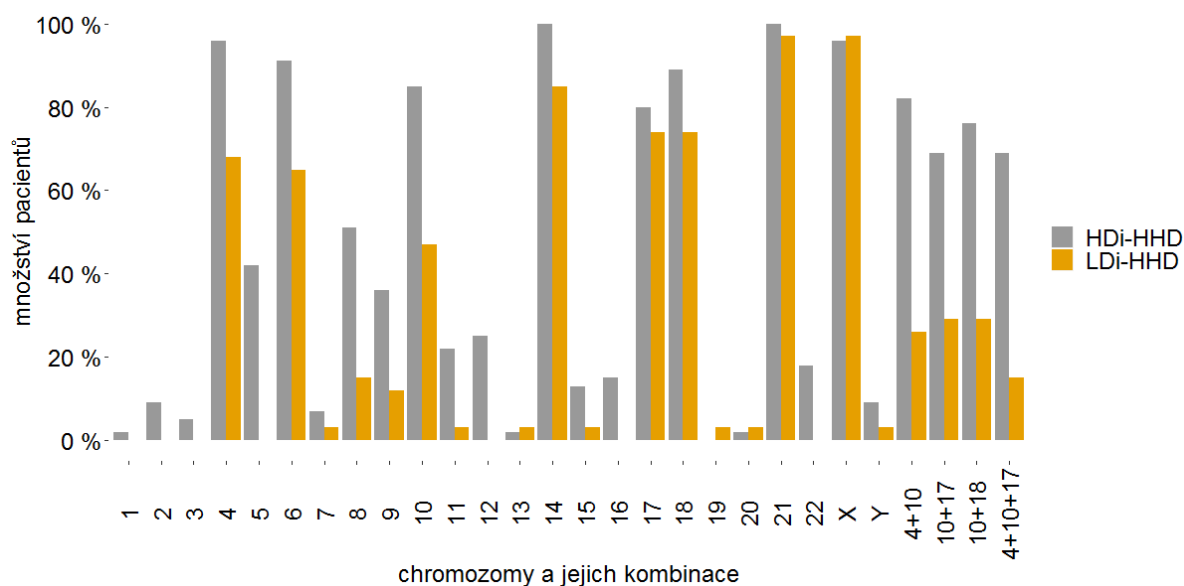
5.2 Hyperdiploidní leukémie

5.2.1 Počty chromozomů a korelace s DNA indexem

Analýza metodou SNP array ukázala, že u většiny pacientů z naší kohorty HHD ALL (53/89 pacientů, 60 %) se počet chromozomů pohyboval v rozmezí 53 -56. Nejčastěji byly zmnoženy chromozomy 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 a X, zatímco chromozomy 1, 2, 3, 7, 13, 15, 16, 19, 20 a Y byly trizomické pouze u zlomku pacientů (< 10 %). Grafy znázorňující počty chromozomů a množství pacientů s konkrétními trizomiemi jsou součástí přílohy (Příloha 2).

Hodnoty DNA indexu (DNA_i) naměřené pomocí průtokové cytometrie byly v rozmezí 1,09 – 1,59. Celková korelace mezi *teoretickým* DNA_i, spočítaným na základě výsledků analýzy SNP array, a DNA_i získaným pomocí průtokové cytometrie byla velmi dobrá ($p < 0,0001$). Součástí korelační analýzy byli i pacienti (54 ALL), kteří nebyli klasifikováni jako HHD ALL (počet chromozomů v jejich leukemických buňkách byl ≤ 50). Až na jednoho pacienta byl u všech pacientů z této skupiny naměřen DNA_i < 1,1. Naproti tomu, u všech pacientů diagnostikovaných s HHD ALL – taktéž s jedinou výjimkou – byla hodnota DNA_i $\geq 1,1$. Na základě korelace mezi počtem chromozomů a hodnotou DNA_i bylo možné rozdělit pacienty do dvou skupin. Hodnota DNA_i $\geq 1,16$ byla – s jednou výjimkou – detekována pouze u pacientů s alespoň 55 chromozomy. Naproti tomu, u pacientů s nižším počtem chromozomů (< 55) byla – vyjma tří případů – naměřena hodnota DNA_i < 1,16.

V následné analýze byla tedy celá kohorta pacientů s hyperdiploidní ALL rozdělena do dvou skupin, a to na základě hodnoty DNA_i. Pacienti s DNA_i < 1,16 (34 HHD ALL) byli označeni jako ti s nízkým DNA indexem (LDi-HHD; low-DNA_i), pacienti s DNA_i $\geq 1,16$ (55 HHD ALL) byli označeni jako ti s vysokým DNA indexem (HDi-HHD; high-DNA_i). Rozdílné zastoupení jednotlivých zmnožených chromozomů u obou skupin (LDi vs. HDi) zobrazuje Obrázek 11. U pacientů s HDi bylo detekováno signifikantně vyšší zastoupení trizomií (a to i kombinovaných) s pozitivním prognostickým dopadem. Avšak též trizomie chromozomu 5 (možný negativní prognostický faktor, (Heerema et al. 2000)) byla popsána u vyššího počtu pacientů s HDi ve srovnání s LDi skupinou.



Obrázek 11 Zastoupení zmnožených chromozomů a jejich kombinací u pacientů s vysokým a nízkým DNA indexem

5.2.2 Variabilita počtu kopií

Variabilita počtu kopií (CNV) byla u HHD pacientů detekována pomocí SNP array. Nejčastějším typem strukturní chromozomové aberace byla amplifikace dlouhého raménka chromozomu 1 (1q), jež byla detekována u 17 pacientů. Nejběžnější typy delecí byly nalezeny v genech, jejichž aberace jsou spojené s dětskými leukémiemi – *CDKN2A/CDKN2B* (13 pacientů), *ETV6* (7 pacientů), *PAX5* (6 pacientů), *IKZF1* (5 pacientů) a *TP53* (4 pacienti). Uniparentální dizomie byla nejčastěji detekována na chromozomu 9 (11 pacientů s celkovou UPD, 3 pacienti s částečnou UPD).

CNV byly ve vyšší míře zastoupeny u pacientů starších tří let. Konkrétní CNV, jejíž výskyt se lišil v závislosti na věku pacientů, byla delece genu *ETV6*. Tato delece byla běžnější u dětí diagnostikovaných ve vyšším věku (medián 72 měsíců vs. 45 měsíců – s vs. bez delece *ETV6*).

5.2.3 Mutace v genech signalizační dráhy RAS a v genu *CREBBP*

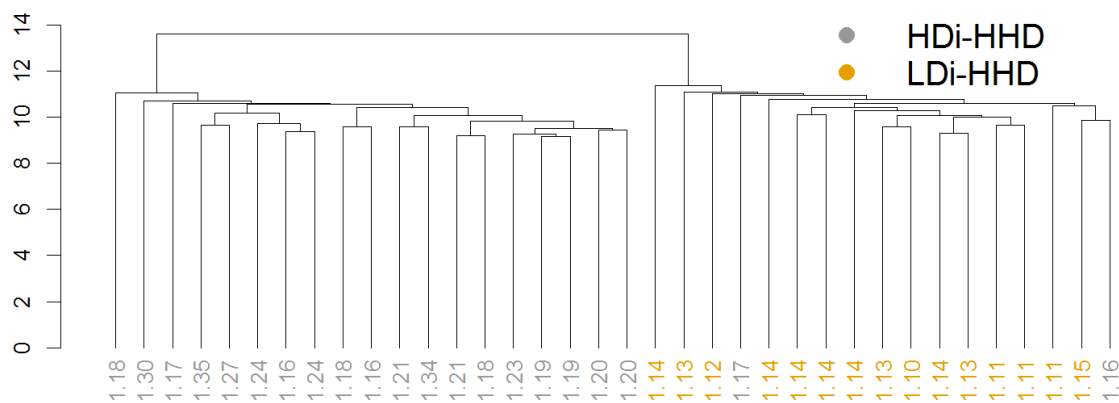
Celkem byly mutace v genech, které se podílejí na signalizaci v rámci signalizační kaskády RAS (*KRAS*, *NRAS*, *FLT3*, *PTPN11*), a v genu *CREBBP* hledány u 85 pacientů. U jednoho pacienta byla využita data získaná pomocí celoexomového sekvenování, u zbylých pacientů byla analýza provedena na základě Sangerova sekvenování. Konkrétní oblasti, v nichž byly mutace hledány, byly odvozeny z dříve publikovaných dat (Malinowska-Ozdowy et al. 2015).

Mutace v některém z genů signalizační kaskády RAS či v genu *CREBBP* byla nalezena u 47 pacientů (55 %). U několika pacientů (9) bylo v diagnostickém vzorku detekováno více mutovaných oblastí, u 4 pacientů byla popsána jak mutace v genu *CREBBP* tak v jednom z genů signalizační dráhy RAS. Nejčastěji byla mutace nalezena v genech *KRAS* (35 % případů) a *NRAS* (12 % případů). V genech *FLT3*, *CREBBP* a *PTPN11* byly mutace detekovány jen u několika pacientů (6 %, 7 % a 8 % případů).

Mutace v genech signalizační dráhy RAS byly asociovány s nižším počtem chromozomů i s nižší hodnotou DNA_i (medián 54 vs. 56 a 1,16 vs. 1,19; $p = 0,013$ a $p = 0,018$ pro pacienty s vs. bez mutace). Dále byly mutace v těchto genech častější u pacientů s dizomií chromozomu 10 ve srovnání s pacienty s trizomií/tetrazomií tohoto chromozomu (19/23 vs. 26/62; $p = 0,0012$).

5.2.4 Expresní profilování

Expresní profilování metodou microarrays bylo provedeno v 36 případech (21 HDi a 15 LDi pacientů). Nesupervidované hierarchické klastrování na základě 10 000 sond s nejvariabilnější expesí rozdělilo pacienty do dvou skupin (viz Obrázek 12). V jedné skupině byli pouze HDi pacienti, v druhé skupině byli kromě pacientů s LDi také dva pacienti s DNA_i $\geq 1,16$ (hodnoty DNA_i určeného průtokovou cytometrií/SNP array: 1,16/1,17 a 1,17/1,162).



Obrázek 12 Dendrogram nesupervidovaného hierarchického klustrování

K nesupervidovanému klustrování byly použity hodnoty exprese 10 000 sond s nejvariabilnější expesí v rámci celé kohorty. Čísla uvedená pod dendrogramem představují hodnoty DNAi naměřené pomocí průtokové cytometrie.

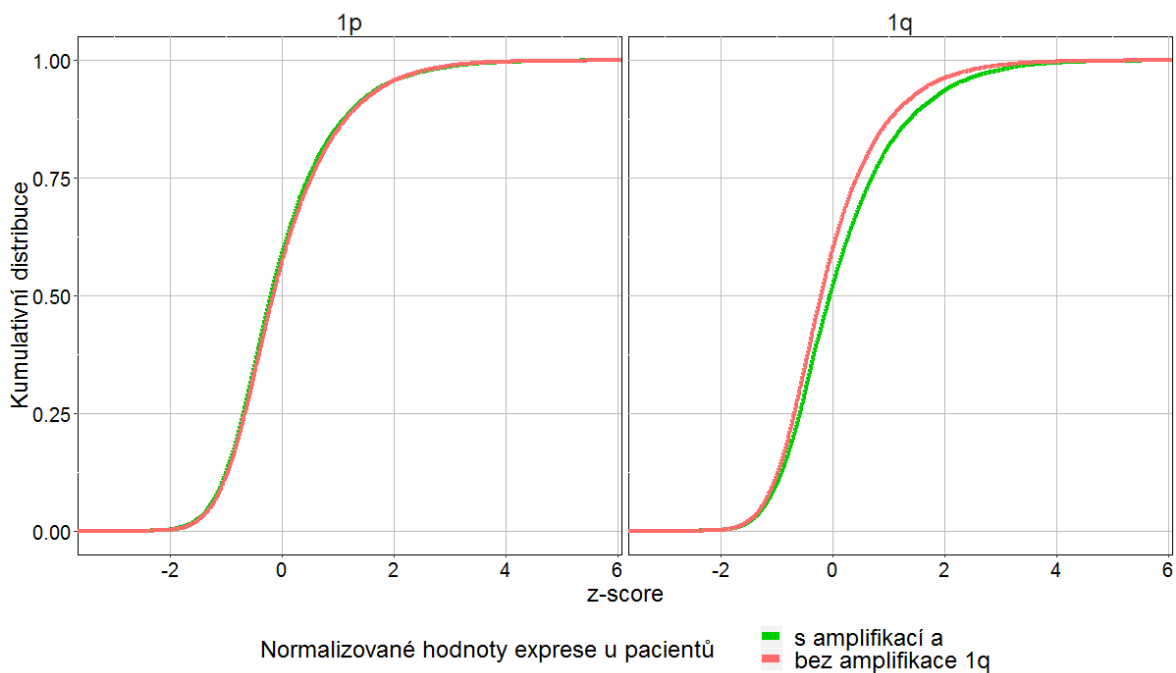
Při analýze rozdílně exprimovaných genů ($p < 0,05$) mezi skupinou pacientů s LDi a HDi bylo nalezeno 92 genů signifikantně více exprimovaných u LDi pacientů a 54 genů signifikantně více exprimovaných u HDi pacientů. Seznam všech rozdílně exprimovaných genů je součástí přílohy (Příloha 2).

Výsledky expresního profilování byly dále využity k „Gene set enrichment“ analýze (GSEA). Pomocí tohoto přístupu je možné sledovat rozdílnou expresi celých sad genů, které se například účastní konkrétního biologického procesu či jsou lokalizovány na určitém úseku chromozomu. Následující parametry byly použity pro kladné vyhodnocení rozdílně exprimovaných genových sad: 1) počet genů v sadě > 30 ; 2) nominal p-value $< 0,01$; 3) false discovery rate $< 0,05$; 4) familywise error rate $< 0,05$; 5) normalised enrichment score $|(NES)| > 1,5$. Celkem bylo takto získáno 64 genových sad, v nichž byly zařazeny geny více exprimované u HDi-HHD případů než u pacientů s LDi-HHD. Sada s nejvyšším NES (= 2,55) byla složena z genů, které se nacházejí v blízkosti genu *CDC27* (*cell division cycle 27*) a jsou společně s ním exprimovány (sada *GNF2_CDC27*, *expression neighbourhoods centred on CDC27*) (Su et al. 2004, Subramanian et al. 2005). Protein *CDC27* je součástí *anaphase promoting complex* (APC), interaguje s proteiny majícími svou

roli v kontrole buněčného cyklu v mitotické fázi (Wu et al. 2000) a může mít tedy vliv na kontrolu počátku mitotického dělení.

Počet genových sad, ve kterých se vyskytovaly geny s vyšší expresí u LDi pacientů ve srovnání s HDi pacienty, byl 43. Nejvyšším NES ($|-2,31|$) byla ohodnocena poziční sada genů ležících na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13). U LDi pacientů byly GSEA analýzou vybrány i další poziční sady: 17p11, 17q11, 17q24, 17q25 a 7p13. Celkový přehled výsledků GSEA je uveden v příloze (Příloha 2).

Na základě dat získaných z expresního profilování byl též analyzován vliv genové dávky na expresi. Hodnoty exprese jednotlivých sond byly normalizovány pomocí z-score (průměr = 0, rozptyl = 1) a následně zobrazeny pomocí kumulativní distribuce. Expese byla takto porovnána na chromozomech 5, 8, 10 a 21. Stejně srovnání bylo provedeno i pro expresi genů lokalizovaných na krátkém a dlouhém raménku chromozomu 1. Pacienti byli vždy rozděleni do dvou skupin, a to na základě počtu kopií daného chromozomu či části chromozomu 1q. Ze srovnání pomocí kumulativní distribuce bylo patrné, že v oblastech zvýšené genové dávky docházelo obecně k vyšší expresi. Je však třeba zdůraznit, že toto zvýšení platilo především pro celé oblasti a netýkalo se všech genů lokalizovaných v amplifikovaných oblastech. Analýza diferenciální exprese ukázala, že rozdíly v expresi jednotlivých genů byly statisticky signifikantní pouze vzácně (chromozom 5: 71 genů; chromozom 8: 7 genů; chromozom 10: 4 geny; chromozom 21: 0 genů). Ukázka kumulativní distribuce exprese zobrazuje Obrázek 13, zbylé výsledky jsou uvedeny v příloze (Příloha 2).

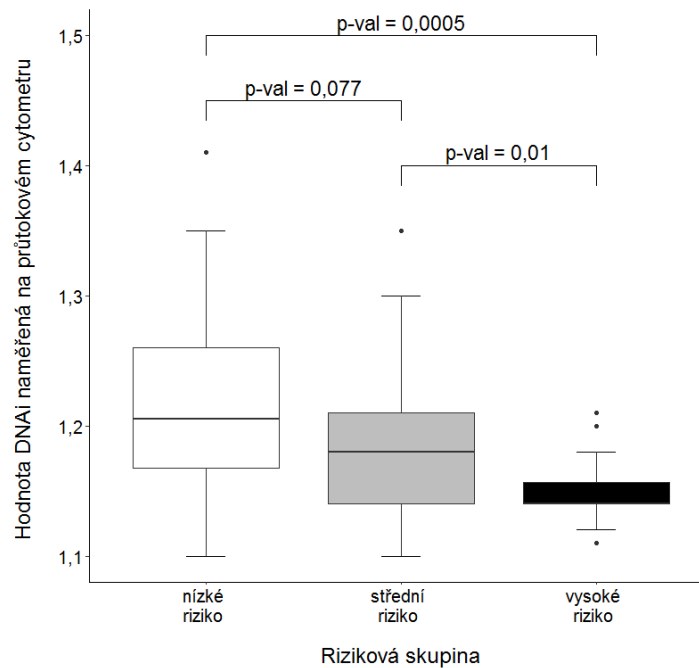


Obrázek 13 Kumulativní distribuce exprese genů ležících na krátkém (1p) a dlouhém (1q) raménku chromozomu 1

5.2.5 Odpověď na léčbu a analýza přežití

Ve skupině pacientů s nízkým DNA_i bylo – ve srovnání se skupinou pacientů s DNA_i $\geq 1,16$ – signifikantně více těch, kteří byli zařazeni do skupiny s vysokým rizikem relapsu onemocnění (14/34 vs. 4/55, $p = 0,0002$). Srovnání hodnot DNA_i v jednotlivých skupinách nízkého, středního a vysokého rizika zobrazuje Obrázek 14. U pacientů zařazených do nízkého/středního rizika byly navíc signifikantně četnější kombinované trizomie (současná trizomie chromozomů 4, 10 a 17: 2/18 vs. 43/71 pacientů vysokého vs. středního/nízkého rizika, $p = 0,0002$; současná trizomie chromozomů 4 a 10: 6/18 vs. 50/71 pacientů vysokého vs. středního/nízkého rizika, $p = 0,0058$; současná trizomie chromozomů 10 a 17: 4/18 vs. 47/71 pacientů vysokého vs. středního/nízkého rizika, $p = 0,0011$) a trizomie chromozomu 10 (8/18 vs. 58/71 pacientů vysokého vs. středního/nízkého rizika, $p = 0,0026$). Taktéž trizomie chromozomu 5, někdy považovaná za negativní prognostický znak, byla signifikantně běžnější u pacientů středního/nízkého rizika (1/18 vs. 22/71 pacientů vysokého vs. středního/nízkého rizika, $p = 0,034$). U pacientů s HD_i byly výše

zmíněné trizomie – s výjimkou trizomie chromozomu 5 – asociovány se signifikantně lepší odpovědí na léčbu měřenou v D15.



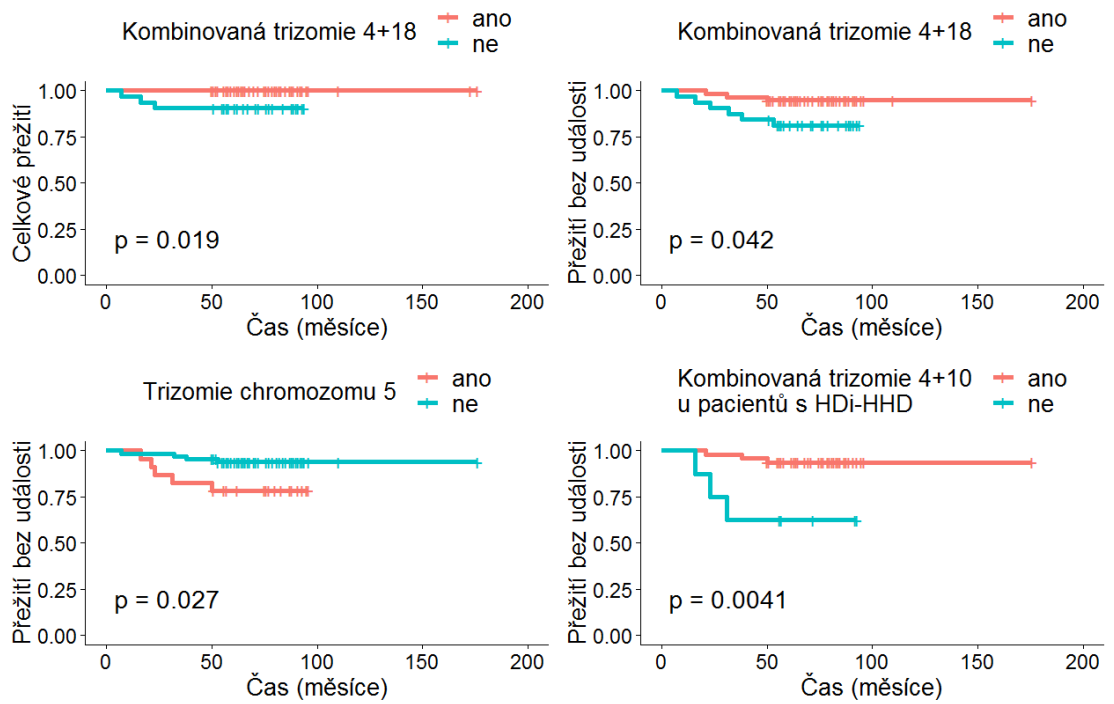
Obrázek 14 Hodnoty DNAi v jednotlivých rizikových skupinách

Srovnání variability počtu kopií, která nepostihovala celé chromozomy, neukázalo významné rozdíly mezi pacienty vysokého a středního/nízkého rizika. Nicméně u HDi pacientů vysokého rizika byly necelochromozomové CNV signifikantně častější než u HDi pacientů středního/nízkého rizika (medián = 6,5 vs. 2; $p = 0,017$). Až na jedinou výjimku nebyla v našem souboru pacientů nalezena žádná asociace mezi odpovědí na léčbu a některým typem CNV či mutací v genech RAS signalizační dráhy a *CREBBP*. Touto výjimkou byla delece v genu *PAX5*, jejíž nositelé vykazovali mírně lepší odpověď na léčbu v D15 ($p = 0,04$).

U pacientů, kteří by byli zařazeni do vysokého rizika na základě pravidel *National Cancer Institute* (NCI; věk > 10 let a/nebo množství leukocytů při diagnóze > $50 \times 10^9/l$; 17 případů), byla detekována celkově horší odpověď na léčbu měřená v D15 – a to jak v celé kohortě pacientů, tak i mezi LDi pacienty (pro obě skupiny bylo $p = 0,039$). V celkovém

srovnání však rozdělení pacientů podle NCI kritérií neodpovídalo stratifikaci pacientů do rizikových skupin na základě odpovědi na léčbu.

Hodnocení celkového přežití a přežití bez události (*event-free survival*, EFS) bylo provedeno na základě údajů získaných do ledna 2019, včetně. V rámci všech 89 vysoce hyperdiploidních pacientů bylo zaznamenáno 9 událostí (6 pacientů s HDi-HHD a 3 pacienti s LDi-HHD) včetně tří úmrtí (2 pacienti s HDi-HHD a 1 pacient s LDi-HHD; medián sledování: 75 měsíců; rozmezí: 7 – 176 měsíců). Kombinovaná trizomie chromozomu 4 a 18 byla v naší kohortě pacientů pozitivním prognostickým faktorem, a to jak pro celkové přežití, tak pro přežití bez události (pětileté EFS: 94,7 % ± 2,9 % vs. 81,1 % ± 6,9 %; pětileté celkové přežití: 100 % vs. 90,6 % ± 5,1 %). Naproti tomu, pacienti s trizomií chromozomu 5 měli horší EFS (pětileté EFS 77,3 % ± 8,9 % vs. 93,7 % ± 3%; viz Obrázek 15). U pacientů s HDi-HHD měla kombinovaná trizomie chromozomu 4 a 10 pozitivní prognostický vliv na EFS (pětileté EFS 93 % ± 3,8 % vs. 62,5 % ± 17,1 %; viz Obrázek 15). V rámci naší analýzy nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v celkovém přežití i přežití bez události mezi pacienty s HDi-HHD a LDi-HHD ani mezi pacienty zařazenými do vysokého a nízkého/středního rizika. Vliv na oba zmíněné typy přežití neměl ani věk při diagnóze, leukocytóza, přítomnost mutace v genech signalizační dráhy RAS či *CREBBP* ani žádná z typů CNV zjištěných v našem souboru pomocí SNP analýzy.



Obrázek 15 Pravděpodobnost celkového přežití a přežití bez událostí u pacientů s vybranými trizomiemi

6 Diskuze

Během několika posledních desetiletí došlo ke zcela zásadnímu vylepšení prognózy pacientů s leukémiemi. Za tímto vylepšením nepochybně stojí, mimo jiné, hlubší poznání biologické podstaty jednotlivých subtypů tohoto onemocnění. Symbolickým příkladem je dramatické vylepšení prognózy pacientů s leukémií s fúzním genem *BCR-ABL1* po zavedení inhibitorů tyrozin kináz do léčebných protokolů (Kantarjian et al. 1998, Arico et al. 2000, Cortes et al. 2016, Biondi et al. 2018). Přesto patří skupina dětských pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL v rámci všech dětí s akutní leukémií i nadále mezi skupiny s nejvyšším rizikem selhání léčby.

Cílem projektu zaměřeného na *BCR-ABL1*-pozitivní leukémie bylo především potvrzení a další prohloubení poznatků o průběhu onemocnění u dětí s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL. Již v minulosti bylo v naší laboratoři ukázáno, že u některých pacientů dochází v průběhu léčby ALL k vymizení lymfoidních leukemických blastů, zatímco buňky exprimující fúzní gen *BCR-ABL1* bylo dál možné detekovat i na vysokých hladinách (Zaliova et al. 2009). U některých pacientů byla potvrzena přítomnost fúzního genu *BCR-ABL1* i mimo lymfoidní buňky. Nebylo však možné vyloučit, že za rozdílnými výsledky MRN měřené pomocí Ig/TCR a exprese *BCR-ABL1* alespoň do jisté míry nestojí technické problémy vyplývající z porovnávání dvou odlišných metodik – kvantifikace klonálních přestaveb imunoreceptorových genů na DNA úrovni a stanovení exprese fúzního genu *BCR-ABL1* na RNA úrovni. Primárním úkolem našeho projektu bylo tedy zavést spolehlivou metodu pro nalezení přechodové sekvence *BCR-ABL1* na genomické úrovni a následně využít tyto specifické sekvence ke stanovení hladiny minimální reziduální nemoci.

Při využívání metody LD-PCR pro nalezení přechodové sekvence je kladen důraz především na kvalitu a délku fragmentů vstupní DNA. U části pacientů však nebylo možné amplifikovat fragmenty delší než 2 – 4 kbp. K analýze rozsáhlých intronových oblastí genů *BCR* a *ABL1* se tato relativně krátká DNA ukázala jako nepostačující. A tak jsme především zavedením metody NGS Custom Target Enrichment získali robustní, spolehlivou a efektivní metodu k nalezení přechodových sekvencí. Tuto metodu lze aplikovat i v návaznosti na celogenomovou amplifikaci u vzorků s nízkou koncentrací vstupní DNA. Následná

analýza vzorků, které se nepodařilo charakterizovat pomocí metody LD-PCR, navíc ukázala na možné nedostatečné pokrytí genů *BCR* i *ABL1* a jejich okolí v několika úsecích. Za nižší úspěšností metody LD-PCR tedy stojí především dva faktory – kvalita DNA a příliš rozsáhlé úseky mezi jednotlivými primery používanými k amplifikaci přechodových sekvencí. K analýze jednotlivých pacientů s fúzí *BCR-ABL1* je však především z hlediska cenové dostupnosti LD-PCR metodou volby (vyšetření NGS se stává finančně srovnatelným až při současné analýze více vzorků v jednom experimentu).

Díky našemu dlouhodobému zájmu a navázané bohaté mezinárodní spolupráci se nám dosud podařilo vyšetřit a nalézt přechodovou sekvenci u 258 dětských a 171 dospělých pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní leukémií. Jedná se o dosud nejrozsáhlejší soubor pacientů, u kterých byl zlom na genomické úrovni charakterizován. Dosud publikované práce se navíc jen výjimečně věnovaly hledání zlomové sekvence typu minor (Score et al. 2010, Rainero et al. 2018), v našem souboru se však jedná o 202 pacienty. Získáním takto širokého souboru bylo tedy možné rozšířit původní záměr i o analýzu přechodových sekvencí.

V rámci pilotní analýzy, která byla provedena na části osekvenovaných vzorků, jsme identifikovali nenáhodnou distribuci konkrétních pozic zlomů v minor i Major oblasti genu *BCR*. Dále bylo patrné signifikantně rozdílné rozložení zlomů v intronu 1 a okolí genu *ABL1* v závislosti na typu zlomu, diagnóze či věku pacientů. Již dřívější studie poukázala na rozdílnou distribuci zlomů v genu *ABL1* mezi dětskými a dospělými pacienty s CML (Krumbholz et al. 2012). Zda je však i v naší skupině pacientů rozhodujícím faktorem věk či má vliv spíše typ zlomu nebo diagnóza je obtížné určit, s ohledem na fakt, že minor typ přestavby se v naší skupině vyskytuje především u dětí s ALL, zatímco fúze typu Major byla detekována hlavně u dospělých pacientů s CML a pouze asi u pětiny dětí s ALL. Za tímto účelem se v současné době snažíme dále rozšířit náš soubor o dospělé pacienty s ALL, s minor i Major typem přestavby.

Na úrovni jednotlivých sekvencí zlomů nebyl nalezen častější výskyt některé z rozptýlených repetice ani kryptických rekombinačních signálních sekvencí v blízkosti místa zlomu. U dvou pacientů, u nichž došlo ke zlomu v Alu elementu, byly však v přechodové oblasti přítomny homologní úseky o délce několika desítek bází. Z naší analýzy vyplývá, že na úrovni primární sekvence DNA nemají rozptýlené repetice ani kryptická signální místa pro RAG rekombinázy zásadní vliv na vznik zlomů, což je v souladu s dříve

publikovanými výsledky u pacientů s Major typem přestavby (Burmeister et al. 2011, Ross et al. 2013). Zda mají tyto sekvence vliv na vyšší strukturu DNA (např. tvorbou smyček, vazbou histonů apod.), a tak ovlivňují její stabilitu, není možné naší analýzou vyhodnotit. S jistotou lze však uvést, že celý proces translokace, při kterém dochází ke vzniku fúzního genu *BCR-ABL1*, je velmi komplexní a může při něm docházet ke vzniku DNA zlomů na několika místech genu *BCR* (inverze genu *BCR*), *ABL1* (inverze genu *ABL1*) i jiného fúzního partnera (inverze genu *ASIC2*). Za následné spojení DNA je pravděpodobně zodpovědný proces nehomologního spojování konců (Mattarucchi et al. 2008, Burmeister et al. 2011, Ross et al. 2013). Pro tento typ mechanismu oprav DNA je charakteristické spojení tupých konců, mikrohomologie v rozsahu až 4 bp či inserce náhodných nukleotidů (Chang et al. 2017). V našem souboru se tyto typy přechodových sekvencí vyskytovaly u více než 90 % pacientů.

Genomické sekvence *BCR-ABL1* fúze byly následně využity ke stanovení hladiny leukemických buněk v kostní dřeni či periferní krvi, a to jak u dětských pacientů s ALL, tak i u dospělých pacientů s CML. Zatímco u dětských pacientů s ALL byla sledována především dynamika průběhu onemocnění v úvodu léčby a její možný prognostický vliv, u pacientů s CML se v současnosti upírá pozornost k citlivé detekci fúzního genu především u pacientů v molekulární remisi onemocnění. Již v několika publikacích bylo ukázáno, že detekce *BCR-ABL1* na genomické úrovni je senzitivnějším přístupem ve srovnání se standardně využívanou kvantifikací exprese fúzního genu (Bartley et al. 2015, Pagani et al. 2018), v kombinaci s digitálním PCR je navíc možné sledovat i velmi nízké hladiny buněk s translokací *BCR-ABL1* (Krumbholz et al. 2019). V rámci projektu probíhajícím v Ústavu hematologie a krevní transfuze (pod vedením doc. Machové) je u pacientů v dlouhodobé molekulární remisi onemocnění stanovována hladina *BCR-ABL1*-pozitivních buněk pomocí genomického přechodu. Část pacientů je v rámci studie EURO-SKI (*Europe Stops TKI in CML*) indikována k vysazení léčby inhibitory tyrozinových kináz. Pacienti jsou k tomuto přerušení léčby indikováni mimo jiné na základě hladiny fúzního transkriptu, jehož detekce je však ve srovnání s genomickým přístupem méně citlivá. Zda by mohla citlivější detekce fúzního genu na DNA úrovni spolehlivěji identifikovat pacienty vhodné k přerušení léčby TKI – přibližně u poloviny pacientů dochází po vysazení k molekulárnímu relapsu onemocnění (Rea et al. 2017, Saussele et al. 2018) – je předmětem připravované publikace.

U dětí s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL je v popředí zájmu především dynamika časné odpovědi na léčbu. V současné době probíhá v rámci léčebného protokolu EsPhALL retrospektivní studie, v níž je analyzován vliv hladiny MRN naměřené pomocí genomického přechodu *BCR-ABL1* na prognózu onemocnění. Tato studie probíhá v návaznosti na naši práci, ve které byla popsána skupina pacientů s dlouhodobě zvýšenou hladinou fúzního genu *BCR-ABL1* a nízkou až nedetekovatelnou hladinou buněk nesoucích klonální přestavbu Ig/TCR. V naší konsekutivní kohortě pacientů byla tato nekorelace nalezena u čtvrtiny pacientů, zatímco ve většině případů si hodnoty naměřené oběma přístupy navzájem odpovídaly. U pacientů s takto korelujícím průběhem MRN byla fúze *BCR-ABL1* detekována pouze v leukemických blastech. Naproti tomu u pacientů s nekorelujícím průběhem MRN byla fúze *BCR-ABL1* detekována v buňkách, které se nacházely mimo dominantní leukemickou populaci a byly Ig/TCR-negativní (jednalo se o myeloidní buňky, T-buňky a nemaligní B-lymfocyty). Tyto výsledky ukazují, že u části pacientů dochází ke vzniku translokace *BCR-ABL1* ve velmi časném progenitoru, čímž se podobají pacientům s chronickou myeloidní leukémií, a proto jsme je v naší práci označili jako pacienty s „CML-like“ leukémií.

Další podobností mezi pacienty s „CML-like“ leukémií a pacienty s typickou CML je vznik delece v genu *IKZF1* v leukemických buňkách. U pacientů s CML je tento typ aberace spojován s progresí z chronické fáze onemocnění do fáze lymfoidního blastického zvratu (Mullighan et al. 2008). U pacientů s „CML-like“ leukémií odpovídalo množství buněk nesoucích deleci v genu *IKZF1* hladinám buněk s klonálními přestavbami genů pro Ig/TCR. Obě skupiny pacientů si navíc byly podobné i významně nižší expresí fúzního genu *BCR-ABL1* ve srovnání s pacienty s „typickou“ *BCR-ABL1*-pozitivní ALL (s dobrou korelací Ig/TCR a *BCR-ABL1* přístupu).

Byť však mají pacienti s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL s nekorelujícím průběhem MRN a pacienti s CML v lymfoidní blastické krizi některé společné znaky, významně se liší v zastoupení *BCR-ABL1*-pozitivních buněk v rámci jednotlivých buněčných populací. I když byl u pacientů s „CML-like“ leukémií fúzní gen detekován i v myeloidních buňkách, jednalo se o nižší hladiny než u pacientů s CML. Navíc, zatímco u pacientů s „CML-like“ leukémií byla translokace *BCR-ABL1* detekována i v T-lymfocytech, u našich dvou pacientů s CML byla tato buněčná populace *BCR-ABL1*-negativní. Pacienti s *BCR-ABL1*-pozitivní

ALL s nekorelujícím průběhem MRN jsou tedy v rámci *BCR-ABL1*-pozitivních leukémií pravděpodobně samostatnou entitou, která se svou biologií liší jak od pacientů s „typickou“ ALL, tak od pacientů s typickou CML v lymfoidní blastické krizi.

Jaký vliv má průběh MRN u „CML-like“ pacientů a pacientů s „typickou“ ALL na celkovou prognózu onemocnění nebylo možné v naší kohortě spolehlivě analyzovat. Jednalo se především o historickou kohortu pacientů, kteří byli léčeni podle několika různých léčebných protokolů či podstoupili individuální léčbu. Nicméně, z naší analýzy se zdá, že pacienti s „CML-like“ leukémií profitovali z časně transplantace hematopoetických kmenových buněk v porovnání s výhradně chemoterapeutickou léčbou. Naproti tomu u pacientů s „typickou“ ALL nebyl v závislosti na typu zvolené léčby nalezen prognostický rozdíl. Otázka celkové prognózy pro pacienty s korelujícím a nekorelujícím průběhem MRN – a tedy s odlišným postižením jednotlivých buněčných populací – je předmětem současné studie, která probíhá v rámci léčebného protokolu EsPhALL.

Téma prognózy bylo reflektováno i v rámci projektu se zaměřením na dětské pacienty s vysoce hyperdiploidní leukémií. Obecně mají tito pacienti velmi dobrou prognózu, nicméně některé studie ukazují v rámci této skupiny na možný prognostický efekt spojený s trizomií konkrétních chromozomů či s počtem zmnožených chromozomů (Heerema et al. 2000, Paulsson et al. 2013). Počet zmnožených chromozomů není však v rámci léčebných protokolů považován za stratifikační kritérium. Navíc ani diagnostika vysoce hyperdiploidních leukémií není mezi léčebnými protokoly jednotná. Pacienty je možné detekovat na základě cytogenetiky, metodou FISH, SNP array či stanovením DNAi (Pui et al. 2009, Reismuller et al. 2017), a tak mohou být výsledné kohorty pacientů s HHD ALL odlišné.

Srovnání hodnot DNAi a počtu chromozomů ukázalo, že pacienti s $\text{DNAi} \geq 1,1$ mají ve většině případů více než 50 chromozomů a patří tedy do skupiny HHD ALL. Přestože pacienti s 51 chromozomy mohou mít i nižší DNAi $\sim 1,09$ (Dastugue et al. 2013), na základě našich dat považujeme hodnotu $\text{DNAi} \geq 1,1$ za diagnosticky relevantní, neboť je takto možné odhalit přes 95 % pacientů s HHD ALL. Naše analýza navíc ukázala, že hodnota DNAi u většiny pacientů s 51 – 54 chromozomy nedosahuje 1,16. Naproti tomu u většiny

pacientů s > 54 chromozomy byla hodnota $DNA_i \geq 1,16$. V rámci našeho projektu tedy sloužila hranice $DNA_i \geq 1,16$ pro zařazení do skupin s nízkým (LDi) a vysokým (HDi) DNA_i . V dříve publikované studii (Dastugue et al. 2013) bylo ukázáno, že významná část pacientů s $DNA_i \geq 1,16$ má, na základě určení karyotypu, v leukemických buňkách 54 chromozomů. V rámci naší práce, v níž byl počet chromozomů stanoven pomocí metody SNP arrays, byl medián DNA_i pro pacienty s 54 chromozomy 1,14 a pouze ve dvou případech dosahovala tato hodnota alespoň 1,16. Toto srovnání ukazuje, že korelace mezi počtem chromozomů a hodnotou DNA_i slouží spíše orientačně a je závislá na metodice zvolené pro stanovení počtu zmnožených chromozomů.

Srovnání pacientů s nízkým a vysokým DNA_i ukázalo na významné rozdíly mezi těmito dvěma skupinami. V rámci skupiny pacientů s HDi bylo – ve srovnání s LDi pacienty – signifikantně více případů s kombinovanými trizomiemi, především s kombinovanou trizomií chromozomů 4, 10 a 17. Naproti tomu, skupina pacientů s LDi byla obohacena o případy s mutací v genech signální dráhy RAS a genu *CREBBP*. Tento rozdíl však nebyl statisticky významný, neboť u významné části pacientů s mutací v některém z těchto genů se hodnota DNA_i pohybovala v rozmezí 1,16 až 1,2. V rámci naší studie však nebyla nalezena souvislost mezi přítomností mutace v genech signální dráhy RAS a odpovědí na léčbu či celkovou prognózou. Ani analýza expresního profilování neukázala na klastrování pacientů s mutací v těchto genech.

Dalším přístupem, který poukázal na obě skupiny pacientů (LDi a HDi) jako na biologicky odlišné entity, bylo nesupervidované hierarchické klastrování vytvořené na základě expresních dat. Tímto byli pacienti rozděleni do dvou skupin dle hodnoty DNA_i – jedna skupina byla tvořena výhradně pacienty s HDi-HHD, zatímco v druhé se kromě pacientů s nízkým DNA_i nacházeli i dva s hraničně vyššími hodnotami DNA_i (1,16 a 1,17). Následnou analýzou rozdílně exprimovaných genů bylo ukázáno, že počet amplifikovaných chromozomů a tím i rozdíl v genové dávce pravděpodobně není primárním důvodem k biologickým odlišnostem mezi skupinami pacientů s HDi-HHD a LDi-HHD. Z celkového počtu 146 rozdílně exprimovaných genů jich byla většina – téměř 2/3 – signifikantně více exprimována u pacientů s nízkým DNA_i , tedy u pacientů s nižším počtem chromozomů. Obecně bylo však možné sledovat vliv ploidie na celkovou expresi genů nacházejících se na amplifikovaných chromozomech, což je v souladu s již dříve publikovanými poznatky

(Gruszka-Westwood et al. 2004, Paulsson et al. 2015). I když při analýze jednotlivých genů, které jsou lokalizovány na amplifikovaných chromozomech, bylo jen malé procento z nich signifikantně více exprimováno u pacientů se zmnožením příslušného chromozomu nebo jeho části.

Pomocí metodiky GSEA byla nalezena celá řada rozdílně exprimovaných genových sad mezi skupinami pacientů s LDi-HHD a HDi-HHD. U pacientů s HDi-HHD se mimo jiné jednalo o několik sad lokalizovaných na chromozomu 10. Amplifikace chromozomu 10 je častější u pacientů s HDi-HHD a zdá se, že by trizomie tohoto chromozomu mohla ovlivňovat zařazení pacientů do rizikových skupin. Je tedy možné, že část genů ležících na tomto chromozomu může – na základě genové dávky – ovlivňovat průběh léčby. Naproti tomu u pacientů s LDi-HHD byla patrná zvýšená exprese genů lokalizovaných v několika oblastech chromozomu 17. Tento chromozom je však amplifikován v podobné míře jak u pacientů s LDi-HHD tak s HDi-HHD. Vliv genové dávky je tudíž třeba v tomto případě zřejmě vyloučit.

Hodnocení časné odpovědi na léčbu ukázalo na častější zařazení pacientů s nízkým DNAi do skupiny s vysokým rizikem relapsu onemocnění. Na základě našich analýz se však zdá, že za zařazením do jednotlivých rizikových skupin nestojí celkový počet amplifikovaných chromozomů jako spíše trizomie chromozomu 10 (v kombinaci s amplifikací chromozomu 4 a/nebo 17). Tento typ trizomie je běžnější právě u pacientů s HDi-HHD a mohl by tedy pozitivně ovlivňovat stratifikaci těchto pacientů do ramen s nižší intenzitou léčby.

Z hlediska celkového přežití a přežití bez události nebyl nalezen zásadní rozdíl mezi pacienty s nízkým a vysokým DNAi. V našem souboru pacientů se jako příznivý faktor ovlivňující pravděpodobnost EFS i celkového přežití projevila kombinovaná trizomie chromozomů 4 a 18. Naopak, z hlediska EFS se jako prognosticky nepříznivá projevila trizomie chromozomu 5, což je v souladu s dříve publikovanými daty (Heerema et al. 2000). U pacientů s HDi-HHD měla příznivý vliv na EFS kombinovaná trizomie chromozomů 4 a 10. S ohledem na celkově nízký počet událostí (6 a 3 pacienti s HDi-HHD respektive s LDi-HHD) je však třeba pohlížet na tento typ analýzy s obezřetností. Rozsáhlá studie pacientů, kteří byli léčeni podle protokolu ALL-BFM (Reismuller et al. 2017) – tedy stejným typem protokolu jako naše kohorta pacientů – ukázala na lepší celkové pětileté

přežití u pacientů s > 53 chromozomy. Za prognosticky významné byly v této studii označeny i trizomie chromozomu 10 či chromozomu 17. Žádný z těchto parametrů však neměl v naší kohortě významný vliv. Celkově je tedy možno shrnout, že přestože se definice dětské hyperdiploidní ALL patrně liší mezi jednotlivými protokoly či pracovními skupinami, obecně tvoří skupinu s velmi dobrou prognózou. I tak je ovšem podle našich dat do jisté míry vnitřně heterogenní a spolehlivějším ukazatelem prognózy se zdá být spíše časná odpověď na léčbu než přítomnost jednotlivých či kombinovaných trizomií.

7 Závěr

V rámci projektu se zaměřením na *BCR-ABL1*-pozitivní leukémie jsme zavedli dvě metody pro charakterizaci *BCR-ABL1* fúze na genomické úrovni – LD-PCR a NGS Custom Target Enrichment. Pomocí těchto dvou přístupů se nám podařilo nalézt přechodovou sekvenci u 428 pacientů. Pilotní analýza fúzních sekvencí neukázala na preferenční vznik zlomů v blízkosti rozptýlených repetice či rekombinačních signálních sekvencí. Přechodové sekvence většiny pacientů ukazují na spojení obou fúzních partnerů NHEJ mechanismem.

Srovnání hladin MRN získaných na základě genomického přechodu *BCR-ABL1* s hladinami získanými detekcí klonálních přestaveb Ig/TCR odhalilo skupinu pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL (v konsekutivní kohortě se jednalo o 25 % pacientů) s dlouhodobě zvýšenými hladinami *BCR-ABL1*-pozitivních buněk. Pacienti v této skupině byli pro svou podobnost s CML označeni jako pacienti s „CML-like“ leukémií. Možné prognostické rozdíly různých léčebných přístupů (chemoterapie vs. transplantace) pro pacienty s „typickou“ *BCR-ABL1*-pozitivní ALL a pacienty s „CML-like“ leukémií jsou předmětem probíhající mezinárodní studie.

Část této práce se též věnovala dětským pacientům s HHD ALL. Pacienty s tímto typem leukémie lze rozdělit na dvě podskupiny, které je možné definovat jak hodnotou DNA_i, tak i počtem chromozomů. Pacienti s LD_i-HHD mají DNA_i < 1,16 a v leukemických buňkách zpravidla nesou 51 – 54 chromozomů, zatímco pacienti s HD_i-HHD mají hodnotu DNA_i v rozmezí 1,16 – 1,6 a v maligních buňkách je obvykle možné detekovat 55 – 67 chromozomů. Obě skupiny se od sebe odlišují expresním profilem a časnou odpovědí na léčbu. Za rychlejší časnou odpověď na léčbu a tím častější stratifikací pacientů s HD_i-HHD do léčebného ramene s nízkým či středním rizikem relapsu onemocnění možná stojí častější výskyt kombinované trizomie chromozomů 4, 10 a 17 u této skupiny pacientů ve srovnání s pacienty s LD_i-HHD. V rámci naší kohorty pacientů však nebyl mezi oběma skupinami nalezen rozdíl v celkovém přežití ani v přežití bez události. Z hlediska celkového přežití by mohla mít prognostický význam kombinovaná trizomie chromozomů 10 a 18, tato data by ovšem musela být potvrzena na nezávislé kohortě pacientů.

8 Přehled publikací a přednášek

Publikace:

Hovorkova L, Zaliova M, Venn NC, Bleckmann K, Trkova M, Potuckova E, Vaskova M, Linhartova J, Machova Polakova K, Fronkova E, Muskovic W, Giles JE, Shaw PJ, Cario G, Sutton R, Sary J, Trka J, Zuna J (2017). Monitoring of childhood ALL using *BCR-ABL1* genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology. *Blood* 129(20):2771-2781. IF 16,6

Zaliova M¹, **Hovorkova L**¹, Vaskova M, Hrusak O, Sary J, Zuna J (2016). Slower early response to treatment and distinct expression profile of childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia with DNA index <1.16. *Genes Chromosomes Cancer* 55(9):727-37. IF 2,9

Linhartova J, **Hovorkova L**, Soverini S, Benesova A, Jaruskova M, Klamova H, Zuna J, Machova Polakova K (2015). Characterization of 46 patient-specific BCR-ABL1 fusions and detection of SNPs upstream and downstream the breakpoints in chronic myeloid leukemia using next generation sequencing. *Mol Cancer* 14:89. IF 10,7

Lizcova L, Zemanova Z, Lhotska H, Zuna J, **Hovorkova L**, Mejstrikova E, Malinova E, Rabasova J, Raska I, Sramkova L, Sary J, Michalova K (2014). An unusual case of high hyperdiploid childhood ALL with cryptic BCR/ABL1 rearrangement. *Mol Cytogenet* 7(1):72. IF 1,3

Publikace přímo nesouvisející s tématem dizertační práce:

Zaliova M, Potuckova E, **Hovorkova L**, Musilova A, Winkowska L, Fiser K, Stuchly J, Mejstrikova E, Starkova J, Zuna J, Sary J, Trka J (2019). *ERG* deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia with *DUX4* rearrangements are mostly polyclonal, prognostically relevant and their detection rate strongly depends on screening method sensitivity. *Haematologica* 104(7):1407-1416. IF 7,6

Potuckova E, Zuna J, **Hovorkova L**, Starkova J, Sary J, Trka J, Zaliova M (2016). Intragenic *ERG* Deletions Do Not Explain the Biology of *ERG*-Related Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One* 11(8). IF 2,8

¹ Sdílené prvoautorství

Přednášky:

Hovorková L, Žaliová M, Venn NC, Bleckmann K, Trková M, Potůčková E, Vášková M, Linhartová J, Machová Poláková K, Cario G, Sutton R, Starý J, Trka J, Zuna J. Monitorování dětských ALL pomocí genomického zlomu BCR-ABL1 odhaluje podskupinu pacientů s CML-like biologií. I. Český hematologický a transfuziologický sjezd 2018 Praha, ČR

Hovorková L, Žaliová M, Trková M, Venn NC, Vášková M, Linhartová J, Machová Poláková K, Sutton R, Starý J, Trka J, Zuna J. Fúzní gen BCR/ABL1 u dětských hematologických malignit – kde je hranice mezi akutní lymfoblastickou a chronickou myeloidní leukémií? Vědecká konference 2. LF UK 2016, Praha, ČR

Hovorková L, Vášková M, Semerák P, Trková M, Zuna J. FACS sorting for FISH analysis. II. Cell Sorter Round Table in Prague, Praha, ČR

Hovorková L, Žaliová M, Venn NC, Muskovic W, Giles JE, Linhartová J, Machová Poláková K, Shaw PJ, Sutton R, Starý J, Trka J, Zuna J. Stanovení minimální reziduální nemoci kvantifikací fúzního genu BCR/ABL1 na genomické úrovni: jsou tyto hladiny srovnatelné s výsledky standardních metod? XXV. Konferenci dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky 2015, Brno, ČR

Hovorková L, Žaliová M, Froňková E, Linhartová J, Mužíková K, Machová Poláková K, Starý J, Trka J, Zuna J. Use of BCR/ABL1 Genomic Breakpoint for Minimal Residual Disease Monitoring in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia and its comparison with other standard methods. XXIX. Olomoucké hematologické dny, 9th Symposium on Advances in Molecular Hematology 2015, Olomouc, ČR

9 Seznam použité literatury

- Alikian, M., P. Ellery, M. Forbes, G. Gerrard, D. Kasperaviciute, A. Sosinsky, M. Mueller, A. S. Whale, D. Milojkovic, J. Apperley, J. F. Huggett, L. Foroni & A. G. Reid (2016) Next-Generation Sequencing-Assisted DNA-Based Digital PCR for a Personalized Approach to the Detection and Quantification of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *J Mol Diagn*, 18, 176-89.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.
- An, X., A. K. Tiwari, Y. Sun, P. R. Ding, C. R. Ashby, Jr. & Z. S. Chen (2010) BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res*, 34, 1255-68.
- Arico, M., M. G. Valsecchi, B. Camitta, M. Schrappe, J. Chessells, A. Baruchel, P. Gaynon, L. Silverman, G. Janka-Schaub, W. Kamps, C. H. Pui & G. Masera (2000) Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 342, 998-1006.
- Bartley, P. A., S. Latham, B. Budgen, D. M. Ross, E. Hughes, S. Branford, D. White, T. P. Hughes & A. A. Morley (2015) A DNA real-time quantitative PCR method suitable for routine monitoring of low levels of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *J Mol Diagn*, 17, 185-92.
- Bartley, P. A., M. H. Martin-Harris, B. J. Budgen, D. M. Ross & A. A. Morley (2010a) Rapid isolation of translocation breakpoints in chronic myeloid and acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 149, 231-6.
- Bartley, P. A., D. M. Ross, S. Latham, M. H. Martin-Harris, B. Budgen, V. Wilczek, S. Branford, T. P. Hughes & A. A. Morley (2010b) Sensitive detection and quantification of minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia using nested quantitative PCR for BCR-ABL DNA. *Int J Lab Hematol*, 32, e222-8.
- Beillard, E., N. Pallisgaard, V. H. van der Velden, W. Bi, R. Dee, E. van der Schoot, E. Delabesse, E. Macintyre, E. Gottardi, G. Saglio, F. Watzinger, T. Lion, J. J. van Dongen, P. Hokland & J. Gabert (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*, 17, 2474-86.
- Biondi, A., V. Gandemer, P. De Lorenzo, G. Cario, M. Campbell, A. Castor, R. Pieters, A. Baruchel, A. Vora, V. Leoni, J. Stary, G. Escherich, C. K. Li, G. Cazzaniga, H. Cave, J. Bradtke, V. Conter, V. Saha, M. Schrappe & M. Grazia Valsecchi (2018) Imatinib treatment of paediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL2010): a prospective, intergroup, open-label, single-arm clinical trial. *Lancet Haematol*, 5, e641-e652.

- Biondi, A., M. Schrappe, P. De Lorenzo, A. Castor, G. Lucchini, V. Gandemer, R. Pieters, J. Stary, G. Escherich, M. Campbell, C. K. Li, A. Vora, M. Arico, S. Rottgers, V. Saha & M. G. Valsecchi (2012) Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol*, 13, 936-45.
- Burmeister, T., D. Groger, A. Kuhn, D. Hoelzer, E. Thiel & R. Reinhardt (2011) Fine structure of translocation breakpoints within the major breakpoint region in BCR-ABL1-positive leukemias. *DNA Repair (Amst)*, 10, 1131-7.
- Caye, A., K. Beldjord, K. Mass-Malo, S. Drunat, J. Soulier, V. Gandemer, A. Baruchel, Y. Bertrand, H. Cave & E. Clappier (2013) Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 98, 597-601.
- Cazzaniga, G., P. De Lorenzo, J. Alten, S. Rottgers, J. Hancock, V. Saha, A. Castor, H. O. Madsen, V. Gandemer, H. Cave, V. Leoni, R. Kohler, G. M. Ferrari, K. Bleckmann, R. Pieters, V. van der Velden, J. Stary, J. Zuna, G. Escherich, U. Z. Stadt, M. Arico, V. Conter, M. Schrappe, M. G. Valsecchi & A. Biondi (2018) Predictive value of minimal residual disease in Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib in the European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, based on immunoglobulin/T-cell receptor and BCR/ABL1 methodologies. *Haematologica*, 103, 107-115.
- Clark, R. E., F. Polydoros, J. F. Apperley, D. Milojkovic, K. Rothwell, C. Pocock, J. Byrne, H. de Lavallade, W. Osborne, L. Robinson, S. G. O'Brien, L. Read, L. Foroni & M. Copland (2019) De-escalation of tyrosine kinase inhibitor therapy before complete treatment discontinuation in patients with chronic myeloid leukaemia (DESTINY): a non-randomised, phase 2 trial. *Lancet Haematol*, 6, e375-e383.
- Cortes, J. E., G. Saglio, H. M. Kantarjian, M. Baccarani, J. Mayer, C. Boque, N. P. Shah, C. Chuah, L. Casanova, B. Bradley-Garelik, G. Manos & A. Hochhaus (2016) Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*, 34, 2333-40.
- Cortes, J. E., M. Talpaz, S. O'Brien, S. Faderl, G. Garcia-Manero, A. Ferrajoli, S. Verstovsek, M. B. Rios, J. Shan & H. M. Kantarjian (2006) Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer*, 106, 1306-15.
- Cumbo, C., L. Impera, C. F. Minervini, P. Orsini, L. Anelli, A. Zagaria, N. Coccaro, G. Tota, A. Minervini, P. Casieri, C. Brunetti, A. R. Rossi, E. Parciante, G. Specchia & F. Albano (2018) Genomic BCR-ABL1 breakpoint characterization by a multi-strategy approach for "personalized monitoring" of residual disease in chronic myeloid leukemia patients. *Oncotarget*, 9, 10978-10986.

- Dastugue, N., S. Suci, G. Plat, F. Speleman, H. Cavé, S. Girard, M. Bakkus, M. P. Pagès, K. Yakouben, B. Nelken, A. Uyttebroeck, C. Gervais, P. Lutz, M. R. Teixeira, P. Heimann, A. Ferster, P. Rohrlich, M. A. Collonge, M. Munzer, I. Luquet, P. Boutard, N. Sirvent, M. Karrasch, Y. Bertrand & Y. Benoit (2013) Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*, 121, 2415-2423.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson & T. R. Gingeras (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15-21.
- Fioretos, T., P. G. Nilsson, P. Aman, S. Heim, U. Kristoffersson, C. Malm, B. Simonsson, I. Turesson & F. Mitelman (1993) Clinical impact of breakpoint position within M-bcr in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 7, 1225-31.
- Gabert, J., E. Beillard, V. H. van der Velden, W. Bi, D. Grimwade, N. Pallisgaard, G. Barbany, G. Cazzaniga, J. M. Cayuela, H. Cave, F. Pane, J. L. Aerts, D. De Micheli, X. Thirion, V. Pradel, M. Gonzalez, S. Viehmann, M. Malec, G. Saglio & J. J. van Dongen (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, 17, 2318-57.
- Grossmann, V., A. Kohlmann, M. Zenger, S. Schindela, C. Eder, S. Weissmann, S. Schnittger, W. Kern, M. C. Muller, A. Hochhaus, T. Haferlach & C. Haferlach (2011) A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia*, Mar 25, 557-60.
- Gruszka-Westwood, A. M., S. W. Horsley, A. Martinez-Ramirez, C. J. Harrison, H. Kempski, A. V. Moorman, F. M. Ross, M. Griffiths, M. F. Greaves & L. Kearney (2004) Comparative expressed sequence hybridization studies of high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 41, 191-202.
- Harper, J. C., K. Dawson, J. D. Delhanty & R. M. Winston (1995) The use of fluorescent in-situ hybridization (FISH) for the analysis of in-vitro fertilization embryos: a diagnostic tool for the infertile couple. *Hum Reprod*, 10, 3255-8.
- Harris, M. B., J. J. Shuster, A. Carroll, A. T. Look, M. J. Borowitz, W. M. Crist, R. Nitschke, J. Pullen, C. P. Steuber & V. J. Land (1992) Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*, 79, 3316-24.
- Heerema, N. A., S. C. Raimondi, J. R. Anderson, J. Biegel, B. M. Camitta, L. D. Cooley, P. S. Gaynon, B. Hirsch, R. E. Magenis, L. McGavran, S. Patil, M. J. Pettenati, J. Pullen, K. Rao, D. Roulston, N. R. Schneider, J. J. Shuster, W. Sanger, M. J. Sutcliffe, P. van Tuinen, M. S. Watson & A. J. Carroll (2007) Specific extra

chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 46, 684-93.

Heerema, N. A., H. N. Sather, M. G. Sensel, T. Zhang, R. J. Hutchinson, J. B. Nachman, B. J. Lange, P. G. Steinherz, B. C. Bostrom, G. H. Reaman, P. S. Gaynon & F. M. Uckun (2000) Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol*, 18, 1876-87.

Hijiya, N. & M. Suttorp (2019) How I treat chronic myeloid leukemia in children and adolescents. *Blood*, 133, 2374-2384.

Hunger, S. P., M. L. Loh, J. A. Whitlock, N. J. Winick, W. L. Carroll, M. Devidas & E. A. Raetz (2013) Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 60, 957-63.

Chang, H. H. Y., N. R. Pannunzio, N. Adachi & M. R. Lieber (2017) Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 495-506.

Christiansen, D. H., F. Desta, M. K. Andersen & J. Pedersen-Bjergaard (2007) Mutations of the PTPN11 gene in therapy-related MDS and AML with rare balanced chromosome translocations. *Genes Chromosomes Cancer*, 46, 517-21.

Jain, P., H. M. Kantarjian, A. Ghorab, K. Sasaki, E. J. Jabbour, G. Noguera Gonzalez, R. Kanagal-Shamanna, G. C. Issa, G. Garcia-Manero, D. Kc, S. Dellasala, S. Pierce, M. Konopleva, W. G. Wierda, S. Verstovsek, N. G. Daver, T. M. Kadia, G. Borthakur, S. O'Brien, Z. Estrov, F. Ravandi & J. E. Cortes (2017) Prognostic factors and survival outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in blast phase in the tyrosine kinase inhibitor era: Cohort study of 477 patients. *Cancer*, 123, 4391-4402.

Jeffs, A. R., S. M. Benjes, T. L. Smith, S. J. Sowerby & C. M. Morris (1998) The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Hum Mol Genet*, 7, 767-76.

Kantarjian, H. M., F. J. Giles, S. M. O'Brien & M. Talpaz (1998) Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 12, 31-80.

Kent, W. J. (2002) BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*, 12, 656-64.

Kiyoi, H., T. Naoe, Y. Nakano, S. Yokota, S. Minami, S. Miyawaki, N. Asou, K. Kuriyama, I. Jinnai, C. Shimazaki, H. Akiyama, K. Saito, H. Oh, T. Motoji, E. Omoto, H. Saito, R. Ohno & R. Ueda (1999) Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 93, 3074-80.

Kotrova, M., K. Muzikova, E. Mejstrikova, M. Novakova, V. Bakardjieva-Mihaylova, K. Fiser, J. Stuchly, M. Giraud, M. Salson, C. Pott, M. Bruggemann, M. Fullgrabe, J. Sary, J. Trka & E. Fronkova (2015) The predictive strength of next-generation

- sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*, 126, 1045-7.
- Kotrova, M., V. H. J. van der Velden, J. J. M. van Dongen, R. Formankova, P. Sedlacek, M. Bruggemann, J. Zuna, J. Stary, J. Trka & E. Fronkova (2017) Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL. *Bone Marrow Transplant*, 52, 962-968.
- Krumbholz, M., K. Goerlitz, C. Albert, J. Lawlor, M. Suttorp & M. Metzler (2019) Large amplicon droplet digital PCR for DNA-based monitoring of pediatric chronic myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med*, 14, 14321.
- Krumbholz, M., M. Karl, J. T. Tauer, C. Thiede, W. Rascher, M. Suttorp & M. Metzler (2012) Genomic BCR-ABL1 breakpoints in pediatric chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 51, 1045-53.
- Langerak, A. W., I. L. Wolvers-Tettero, E. J. van Gastel-Mol, M. E. Oud & J. J. van Dongen (2001) Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. *Blood*, 98, 2456-65.
- Linhartova, J., L. Hovorkova, S. Soverini, A. Benesova, M. Jaruskova, H. Klamova, J. Zuna & K. Machova Polakova (2015) Characterization of 46 patient-specific BCR-ABL1 fusions and detection of SNPs upstream and downstream the breakpoints in chronic myeloid leukemia using next generation sequencing. *Mol Cancer*, 14, 89.
- Look, A. T., P. K. Roberson, D. L. Williams, G. Rivera, W. P. Bowman, C. H. Pui, J. Ochs, M. Abromowitch, D. Kalwinsky, G. V. Dahl & et al. (1985) Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 65, 1079-86.
- Maia, A. T., V. H. van der Velden, C. J. Harrison, T. Szczepanski, M. D. Williams, M. J. Griffiths, J. J. van Dongen & M. F. Greaves (2003) Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia*, 17, 2202-6.
- Malinowska-Ozdowy, K., C. Frech, A. Schonegger, C. Eckert, G. Cazzaniga, M. Stanulla, U. zur Stadt, A. Mecklenbrauker, M. Schuster, D. Kneidinger, A. von Stackelberg, F. Locatelli, M. Schrappe, M. A. Horstmann, A. Attarbaschi, C. Bock, G. Mann, O. A. Haas & R. Panzer-Grumayer (2015) KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 29, 1656-67.
- Martinelli, G., I. Iacobucci, C. T. Storlazzi, M. Vignetti, F. Paoloni, D. Cilloni, S. Soverini, A. Vitale, S. Chiaretti, G. Cimino, C. Papayannidis, S. Paolini, L. Elia, P. Fazi, G. Meloni, S. Amadori, G. Saglio, F. Pane, M. Bacarani & R. Foa (2009) IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol*, 27, 5202-7.

- Mattarucchi, E., V. Guerini, A. Rambaldi, L. Campiotti, A. Venco, F. Pasquali, F. Lo Curto & G. Porta (2008) Microhomologies and interspersed repeat elements at genomic breakpoints in chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 47, 625-32.
- McPherson, A., F. Hormozdiari, A. Zayed, R. Giuliany, G. Ha, M. G. Sun, M. Griffith, A. Heravi Moussavi, J. Senz, N. Melnyk, M. Pacheco, M. A. Marra, M. Hirst, T. O. Nielsen, S. C. Sahinalp, D. Huntsman & S. P. Shah (2011) deFuse: an algorithm for gene fusion discovery in tumor RNA-Seq data. *PLoS Comput Biol*, 7, 19.
- Melo, J. V. (1996) The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 88, 2375-84.
- Merelli, I., A. Guffanti, M. Fabbri, A. Cocito, L. Furia, U. Grazini, R. J. Bonnal, L. Milanese & F. McBlane (2010) RSSsite: a reference database and prediction tool for the identification of cryptic Recombination Signal Sequences in human and murine genomes. *Nucleic Acids Res*, 38, W262-7.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res*, 16, 1215.
- Moorman, A. V., S. M. Richards, M. Martineau, K. L. Cheung, H. M. Robinson, G. R. Jalali, Z. J. Broadfield, R. L. Harris, K. E. Taylor, B. E. Gibson, I. M. Hann, F. G. Hill, S. E. Kinsey, T. O. Eden, C. D. Mitchell & C. J. Harrison (2003) Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 102, 2756-62.
- Mullighan, C. G. (2012) Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*, 122, 3407-15.
- Mullighan, C. G., C. B. Miller, I. Radtke, L. A. Phillips, J. Dalton, J. Ma, D. White, T. P. Hughes, M. M. Le Beau, C. H. Pui, M. V. Relling, S. A. Shurtleff & J. R. Downing (2008) BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, 453, 110-4.
- Nakayama, H., F. Ishimaru, N. Avitahl, N. Sezaki, N. Fujii, K. Nakase, Y. Ninomiya, A. Harashima, J. Minowada, J. Tsuchiyama, K. Imajoh, T. Tsubota, S. Fukuda, T. Sezaki, K. Kojima, M. Hara, H. Takimoto, S. Yorimitsu, I. Takahashi, A. Miyata, S. Taniguchi, Y. Tokunaga, H. Gondo, Y. Niho, M. Harada & et al. (1999) Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*, 59, 3931-4.
- Pagani, I. S., P. Dang, I. O. Kommers, J. M. Goynes, M. Nicola, V. A. Saunders, J. Braley, D. L. White, D. T. Yeung, S. Branford, T. P. Hughes & D. M. Ross (2018) BCR-ABL1 genomic DNA PCR response kinetics during first-line imatinib treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 103, 2026-2032.
- Pagani, I. S., O. Spinelli, E. Mattarucchi, C. Pirrone, D. Pigni, E. Amelotti, S. Lilliu, C. Boroni, T. Intermesoli, U. Giussani, L. Caimi, F. Bolda, R. Baffelli, E. Candi, F.

- Pasquali, F., Lo Curto, A., Lanfranchi, F., Porta, A., Rambaldi & G. Porta (2014) Genomic quantitative real-time PCR proves residual disease positivity in more than 30% samples with negative mRNA-based qRT-PCR in Chronic Myeloid Leukemia. *Oncoscience*, 1, 510-21.
- Pane, F., Frigeri, M., Sindona, L., Luciano, F., Ferrara, R., Cimino, G., Meloni, G., Saglio, F., Salvatore & B. Rotoli (1996) Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*, 88, 2410-4.
- Paschka, P., J. Du, R. F. Schlenk, V. I. Gaidzik, L. Bullinger, A. Corbacioglu, D. Spath, S. Kayser, B. Schlegelberger, J. Krauter, A. Ganser, C. H. Kohne, G. Held, M. von Lilienfeld-Toal, H. Kirchen, M. Rummel, K. Gotze, H. A. Horst, M. Ringhoffer, M. Lubbert, M. Wattad, H. R. Salih, A. Kundgen, H. Dohner & K. Dohner (2013) Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AML5SG). *Blood*, 121, 170-7.
- Paulsson, K., E. Forestier, M. K. Andersen, K. Autio, G. Barbany, G. Borgstrom, L. Cavelier, I. Golovleva, S. Heim, K. Heinonen, R. Hovland, J. H. Johannsson, E. Kjeldsen, A. Nordgren, L. Palmqvist & B. Johannsson (2013) High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocols. *Haematologica*, 98, 1424-32.
- Paulsson, K., E. Forestier, H. Lilljebjorn, J. Heldrup, M. Behrendtz, B. D. Young & B. Johannsson (2010) Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 21719-24.
- Paulsson, K., A. Horvat, B. Strombeck, F. Nilsson, J. Heldrup, M. Behrendtz, E. Forestier, A. Andersson, T. Fioretos & B. Johannsson (2008) Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 47, 26-33.
- Paulsson, K., H. Lilljebjorn, A. Biloglav, L. Olsson, M. Rissler, A. Castor, G. Barbany, L. Fogelstrand, A. Nordgren, H. Sjogren, T. Fioretos & B. Johannsson (2015) The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 47, 672-6.
- Paulsson, K., H. Morse, T. Fioretos, M. Behrendtz, B. Strombeck & B. Johannsson (2005) Evidence for a single-step mechanism in the origin of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 44, 113-22.
- Porta, G., I. S. Pagani & C. Pirrone (2015) gDNA Q-PCR for clinical monitoring of CML. *Cell Cycle*, 14.
- Pui, C. H., D. Campana, D. Pei, W. P. Bowman, J. T. Sandlund, S. C. Kaste, R. C. Ribeiro, J. E. Rubnitz, S. C. Raimondi, M. Onciu, E. Coustan-Smith, L. E. Kun, S. Jeha, C.

- Cheng, S. C. Howard, V. Simmons, A. Bayles, M. L. Metzger, J. M. Boyett, W. Leung, R. Handgretinger, J. R. Downing, W. E. Evans & M. V. Relling (2009) Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*, 360, 2730-41.
- Quintas-Cardama, A. & J. Cortes (2009) Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*, 113, 1619-30.
- Rainero, A., F. Angaroni, F. D'Avila, A. Conti, C. Pirrone, G. Micheloni, L. Tarara, G. Millefanti, E. Maserati, R. Valli, O. Spinelli, K. Buklijas, A. Michelato, R. Casalone, C. Barlassina, M. Barcella, S. Sirchia, E. Piscitelli, M. Caccia & G. Porta (2018) gDNA qPCR is statistically more reliable than mRNA analysis in detecting leukemic cells to monitor CML. *Cell Death Dis*, 9, 018-0387.
- Rea, D., F. E. Nicolini, M. Tulliez, F. Guilhot, J. Guilhot, A. Guerci-Bresler, M. Gardembas, V. Coiteux, G. Guillermin, L. Legros, G. Etienne, J. M. Pignon, B. Villemagne, M. Escoffre-Barbe, J. C. Ianotto, A. Charbonnier, H. Johnson-Ansah, M. P. Noel, P. Rousselot & F. X. Mahon (2017) Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood*, 129, 846-854.
- Reismuller, B., M. Steiner, H. Pichler, M. Dworzak, C. Urban, B. Meister, K. Schmitt, U. Potechger, M. Konig, G. Mann, O. A. Haas & A. Attarbaschi (2017) High hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL)-A 25-year population-based survey of the Austrian ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) Study Group. *Pediatr Blood Cancer*, 64, 2.
- Ross, D. M., S. Branford, J. F. Seymour, A. P. Schwarzer, C. Arthur, P. A. Bartley, C. Slader, C. Field, P. Dang, R. J. Filshie, A. K. Mills, A. P. Grigg, J. V. Melo & T. P. Hughes (2010) Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia*, 24, 1719-24.
- Ross, D. M., M. O'Hely, P. A. Bartley, P. Dang, J. Score, J. M. Goynes, M. Sobrinho-Simoes, N. C. Cross, J. V. Melo, T. P. Speed, T. P. Hughes & A. A. Morley (2013) Distribution of genomic breakpoints in chronic myeloid leukemia: analysis of 308 patients. *Leukemia*, 27, 2105-7.
- Ross, D. M., I. S. Pagani, N. Shanmuganathan, C. H. Kok, J. F. Seymour, A. K. Mills, R. J. Filshie, C. K. Arthur, P. Dang, V. A. Saunders, J. Braley, A. S. Yong, D. T. Yeung, D. L. White, A. P. Grigg, A. P. Schwarzer, S. Branford & T. P. Hughes (2018) Long-term treatment-free remission of chronic myeloid leukemia with falling levels of residual leukemic cells. *Leukemia*, 32, 2572-2579.
- Russo, D., M. Malagola, C. Skert, V. Cancelli, D. Turri, P. Pregno, M. Bergamaschi, M. Fogli, N. Testoni, A. De Vivo, F. Castagnetti, E. Pungolino, F. Stagno, M. Breccia, B. Martino, T. Intermesoli, G. R. Cambrin, G. Nicolini, E. Abruzzese, M. Tiribelli, C. Bigazzi, E. Usala, S. Russo, A. Russo-Rossi, M. Lunghi, M. Bocchia, A. D'Emilio, V. Santini, M. Girasoli, R. D. Lorenzo, S. Bernardi, A. D. Palma, B. M.

- Cesana, S. Soverini, G. Martinelli, G. Rosti & M. Baccarani (2015) Managing chronic myeloid leukaemia in the elderly with intermittent imatinib treatment. *Blood Cancer J*, 18, 75.
- Saussele, S., J. Richter, J. Guilhot, F. X. Gruber, H. Hjorth-Hansen, A. Almeida, J. Janssen, J. Mayer, P. Koskenvesa, P. Panayiotidis, U. Olsson-Stromberg, J. Martinez-Lopez, P. Rousselot, H. Vestergaard, H. Ehrencrona, V. Kairisto, K. Machova Polakova, M. C. Muller, S. Mustjoki, M. G. Berger, A. Fabarius, W. K. Hofmann, A. Hochhaus, M. Pffirmann & F. X. Mahon (2018) Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*, 19, 747-757.
- Score, J., M. J. Calasanz, O. Ottman, F. Pane, R. F. Yeh, M. A. Sobrinho-Simoes, S. Kreil, D. Ward, C. Hidalgo-Curtis, J. V. Melo, J. Wiemels, B. Nadel, N. C. Cross & F. H. Grand (2010) Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. *Leukemia*, 24, 1742-50.
- Shibata, Y., A. Malhotra & A. Dutta (2010) Detection of DNA fusion junctions for BCR-ABL translocations by Anchored ChromPET. *Genome Med*, 2, 70.
- Smit, A., R. Hubley & P. Green. RepeatMasker Open-4.0. 2013-2015.
- Sobrinho-Simoes, M., V. Wilczek, J. Score, N. C. Cross, J. F. Apperley & J. V. Melo (2010) In search of the original leukemic clone in chronic myeloid leukemia patients in complete molecular remission after stem cell transplantation or imatinib. *Blood*, 116, 1329-35.
- Sowerby, S. J., M. A. Kennedy, P. H. Fitzgerald & C. M. Morris (1993) DNA sequence analysis of the major breakpoint cluster region of the BCR gene rearranged in Philadelphia-positive human leukemias. *Oncogene*, 8, 1679-83.
- Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker & J. B. Hogenesch (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6062-7.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander & J. P. Mesirov (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15545-50.
- Suttorp, M., P. Schulze, I. Glauche, G. Gohring, N. von Neuhoff, M. Metzler, P. Sedlacek, E. de Bont, A. Balduzzi, B. Lausen, O. Aleinikova, S. Sufliarska, G. Henze, G. Strauss, A. Eggert, B. Kremens, A. H. Groll, F. Berthold, C. Klein, U. Gross-Wieltsch, K. W. Sykora, A. Borkhardt, A. E. Kulozik, M. Schrappe, C. Nowasz, M. Krumbholz, J. T. Tauer, A. Claviez, J. Harbott, H. H. Kreipe, B. Schlegelberger & C. Thiede (2018) Front-line imatinib treatment in children and adolescents with chronic myeloid leukemia: results from a phase III trial. *Leukemia*, 32, 1657-1669.

- Thorsen, J., F. Micci & S. Heim (2011) Identification of chromosomal breakpoints of cancer-specific translocations by rolling circle amplification and long-distance inverse PCR. *Cancer Genet*, 204, 458-61.
- van der Veer, A., M. Zaliova, F. Mottadelli, P. De Lorenzo, G. Te Kronnie, C. J. Harrison, H. Cave, J. Trka, V. Saha, M. Schrappe, R. Pieters, A. Biondi, M. G. Valsecchi, M. Stanulla, M. L. den Boer & G. Cazzaniga (2014) IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. *Blood*, 123, 1691-8.
- van der Velden, V. H., G. Cazzaniga, A. Schrauder, J. Hancock, P. Bader, E. R. Panzer-Grumayer, T. Flohr, R. Sutton, H. Cave, H. O. Madsen, J. M. Cayuela, J. Trka, C. Eckert, L. Foroni, U. Zur Stadt, K. Beldjord, T. Raff, C. E. van der Schoot & J. J. van Dongen (2007) Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*, 21, 604-11.
- van der Velden, V. H., J. M. Wijkhuijs, D. C. Jacobs, E. R. van Wering & J. J. van Dongen (2002a) T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia*, 16, 1372-80.
- van der Velden, V. H. J., M. J. Willemse, C. E. van der Schoot, K. Hahlen, E. R. van Wering & J. J. M. van Dongen (2002b) Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*, 16, 928-936.
- van Dongen, J. J., A. W. Langerak, M. Bruggemann, P. A. Evans, M. Hummel, F. L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurin, R. Garcia-Sanz, J. H. van Krieken, J. Droese, D. Gonzalez, C. Bastard, H. E. White, M. Spaargaren, M. Gonzalez, A. Parreira, J. L. Smith, G. J. Morgan, M. Kneba & E. A. Macintyre (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17, 2257-317.
- Venn, N. C., V. H. van der Velden, M. de Bie, E. Waanders, J. E. Giles, T. Law, R. P. Kuiper, V. de Haas, C. G. Mullighan, M. Haber, G. M. Marshall, N. Md, J. J. van Dongen & R. Sutton (2012) Highly sensitive MRD tests for ALL based on the IKZF1 Delta3-6 microdeletion. *Leukemia*, 26, 1414-6.
- Verhagen, O. J., M. J. Willemse, W. B. Breunis, A. J. Wijkhuijs, D. C. Jacobs, S. A. Joosten, E. R. van Wering, J. J. van Dongen & C. E. van der Schoot (2000) Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 14, 1426-35.

- Verma, D., H. M. Kantarjian, D. Jones, R. Luthra, G. Borthakur, S. Verstovsek, M. B. Rios & J. Cortes (2009) Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood*, 114, 2232-5.
- Waller, C. F., G. Dennebaum, C. Feldmann & W. Lange (1999) Long-template DNA polymerase chain reaction for the detection of the bcr/abl translocation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 5, 4146-51.
- Williams, D. L., A. Tsiatis, G. M. Brodeur, A. T. Look, S. L. Melvin, W. P. Bowman, D. K. Kalwinsky, G. Rivera & G. V. Dahl (1982) Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 60, 864-71.
- Wu, H., Z. Lan, W. Li, S. Wu, J. Weinstein, K. M. Sakamoto & W. Dai (2000) p55CDC/hCDC20 is associated with BUBR1 and may be a downstream target of the spindle checkpoint kinase. *Oncogene*, 19, 4557-62.
- Yates, A., W. Akanni, M. R. Amode, D. Barrell, K. Billis, D. Carvalho-Silva, C. Cummins, P. Clapham, S. Fitzgerald, L. Gil, C. G. Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S. E. Hunt, S. H. Janacek, N. Johnson, T. Juettemann, S. Keenan, I. Lavidas, F. J. Martin, T. Maurel, W. McLaren, D. N. Murphy, R. Nag, M. Nuhn, A. Parker, M. Patricio, M. Pignatelli, M. Rahtz, H. S. Riat, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, S. P. Wilder, A. Zadissa, E. Birney, J. Harrow, M. Muffato, E. Perry, M. Ruffier, G. Spudich, S. J. Trevanion, F. Cunningham, B. L. Aken, D. R. Zerbino & P. Flicek (2016) Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res*, 44, D710-6.
- Zaliova, M., E. Fronkova, K. Krejcikova, K. Muzikova, E. Mejstrikova, J. Stary, J. Trka & J. Zuna (2009) Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring. *Leukemia*, 23, 944-51.
- Zhang, J. G., J. M. Goldman & N. C. Cross (1995) Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR. *Br J Haematol*, 90, 138-46.
- Zhang, J. G., F. Lin, A. Chase, J. M. Goldman & N. C. Cross (1996) Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 87, 2588-93.
- Zuna, J. & M. Zaliova (2015) Etiologie dětských ALL a AML, molekulární genetika a minimální reziduální nemoc. *Čes-slov Pediat*, 70, 70-84.

10 Přílohy