

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Přestavby genu KMT2A (MLL)  
**Pavlna Nejedlová**

Bakalářská práce

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavína Nejedlová**  
Osobní číslo: **C16265**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Přestavby genu KMT2A (MLL)**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Student vypracuje rešerši dle zásad UPa s následujícím řazením kapitol:

- 1) Gen MLL
- 2) Přestavby genu MLL
- 3) Význam přestaveb genu MLL u leukémií
- 4) Metody detekce přestaveb genu MLL

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.**  
Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 8. července 2020

Pavλίna Nejedlová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych tímto poděkovala panu PharmDr. Antonínu Librovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, za cenné a užitečné rady, připomínky, trpělivost a vstřícnost. Děkuji své rodině a přátelům za veškerou podporu a trpělivost během studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je věnována problematice genu MLL (KMT2A), který je lokalizován na chromozomu 11. Přestavby genu MLL spolu s velkým počtem fúzních partnerských genů doprovází vznik maligního hematologického onemocnění. Přítomnost fúzních proteinů, které jsou výsledkem chromozomálních aberací genu MLL, jsou charakteristické pro akutní myeloidní a lymfoblastické leukémie. Právě aberace genu MLL jsou považovány za velmi důležitý diagnostický a prognostický ukazatel. V poslední části práce se zaměřuji na detekci, která umožňuje identifikovat chromozomální přestavby.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

MLL, akutní myeloidní/lymfoblastická leukémie, translokace, fúze

## **TITLE**

Rearrangements of gene KMT2A (MLL)

## **ANNOTATION**

This bachelor's thesis deals with the issue of the MLL gene (KMT2A), which is located on chromosome 11. Rearrangements of the MLL gene together with a large number of fusion partner genes are accompanied by the development of malignant haematological disease. The presence of fusion proteins resulting from chromosomal aberrations of the MLL gene is characteristic of acute myeloid and lymphoblastic leukaemia. It is the aberrations of the MLL gene that are considered to be a very important diagnostic and prognostic indicator. The last part of this work is focused on detection, which allows to identify chromosomal rearrangements.

## **KEYWORDS**

MLL, acute myeloid/lymphoblastic leukemia, translocation, fusion

# OBSAH

<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>9</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>10</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Gen</b> .....	<b>12</b>
1.1 Gen MLL .....	12
1.1.1 Struktura genu.....	13
1.1.2 Molekulární podstata .....	15
1.1.3 Funkce genu.....	16
<b>2 Přestavby genu MLL</b> .....	<b>17</b>
2.1 Translokace genu .....	18
2.2 Fúze genu MLL .....	20
2.2.1 Fúze MLL-AF4.....	20
2.2.2 Fúze MLL-AF6.....	20
2.2.3 Fúze MLL-AF9.....	21
2.2.4 Fúze MLL-AF10.....	21
2.2.5 Fúze MLL-ENL .....	22
2.2.6 Fúze MLL-ELL .....	22
2.3 Amplifikace genu MLL .....	23
2.4 Duplikace genu MLL.....	24
2.5 Delece genu MLL .....	24
<b>3 Význam přestaveb genu MLL u leukémií</b> .....	<b>25</b>
3.1 Akutní Leukémie .....	25
3.1.1 Akutní myelodní leukémie .....	26
3.1.2 Akutní lymfoblastická leukemie.....	29
<b>4 Metody detekce přestaveb genu MLL</b> .....	<b>32</b>
4.1 Analýza karyotypu.....	32
4.1.1 Lidský karyotyp .....	32
4.1.2 Vyšetření karyotypu.....	32
4.2 Fluorescenční hybridizace in situ .....	34

4.3	Polymerázová řetězová reakce.....	35
4.3.1	RT-PCR .....	36
4.3.2	Real time PCR .....	36
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>39</b>

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Komplex MLL s funkčními doménami [51] .....	15
Obrázek 2: Struktura exonů se zlomovým místem genu MLL [52] .....	18
Obrázek 3: Grafické znázornění četnosti partnerských fúzních genů MLL [53] .....	19
Obrázek 4: A - karyotyp s translokací 11;19, B – FISH s dvěma fúzními signály genu MLL/ENL [54] .....	34

## Seznam zkratek

AF4	AF4/FMR2 familymember 1
AF6	protein afadin kódující gen AFDN
AF9	MLLT3 super elongation complex subunit
AF10	MLLT10 histone lysine methyltransferase DOT1L cofactor
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
ASH2L	Set1/Ash2 histone methyltransferasecomplexsubunit ASH2
ATP	nukleotid adenosintrifosfát
CxxC	Cfp1 - CXXC-type zincfinger protein 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
DOT1L	Disruptoroftelomeric silencing1-like
ENL	fúzní partner genu, elevenineteen leukemia gene
ELL	fúzní partner genu, elevenineteenlysin richleukemia gene
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GTP	nukleotid guanosintrifosfát
H3K4	histone H3 lysine 4
LEDGF	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
M-FISH	Multicolour fluorescence in situ hybridization
MLL	myeloid/lymphoid leukemia
MLL-bcr	MLL breakpoint cluster region
MLL PTD	částečná tandemová duplikace MLL
PCR	polymerázová řetězová reakce
PHD	Plant homeodomain
PWWP	aminokyselinový motiv prolin-tryptofan-tryptofan-prolin
RBP5	Retinol Binding Protein 5
RT – PCR	reverzní transkriptázová PCR
rtPCR	PCR v reálném čase
RUNX1	Runt-relatedtranscriptionfactor 1
SET	Su(var)3-9, enhancerofzeste, trithorax
WDR5	WD repeat-containing protein 5
WHO	Světová zdravotnická organizace

## Úvod

Geny patří neodmyslitelně mezi základní jednotky dědičných informací kódující úsek DNA na chromozomu, díky kterým může vznikat jedinečnost každého z nás. Dědičné informace jsou předávány z generace na generaci a předurčují vlastnosti každého jedince. Problematika dědičnosti nastává ve chvíli, kdy dochází k přestavbě genů. Právě následkem různých strukturních změn chromozomů mohou vznikat onemocnění, s kterými se potýkáme v běžném životě. Nádorová onemocnění patří mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí, jejich nástup je často ojedinělý a nemusí být podmínkou dědičnosti.

Práce pojednává o problematice genu MLL (KMT2A), jehož přestavba způsobí narušení kódujícího jaderného proteinu MLL. Při přestavbě genu MLL dochází k funkčnímu narušení proteinu MLL a následně k nedostatečné ochraně před vznikem maligního hematologického onemocnění. Jedná se o akutní leukémie, které jsou vyvolány strukturní chromozomální změnou tzv. aberací genu MLL. Chromozomální aberace nejčastěji zahrnují translokace s fúzními partnerskými geny MLL, zmnožení genu neboli amplifikace či chybějící částí genu zvanou delece. Doposud bylo na molekulární úrovni charakterizováno přibližně 80 přímých a 120 recipročních fúzí genu MLL, ačkoli u většiny forem akutních leukémií je nejčastěji diagnostikována fúze s šesti partnerskými geny MLL.

Translokace genu MLL jsou detekovány zhruba v 10 % všech případů u leukémií. Pomocí speciálně detekovatelných přístrojů je možné pozorovat a zaznamenávat jednotlivé aberace. Pro přesnější stanovení nestačí klasické určení lidského karyotypu, a proto se v dnešní době používají molekulárně cytogenetické metody, které přesněji odhalí jednotlivé translokace genu MLL. Právě identifikace chromozomových změn jsou velmi užitečným ukazatelem k přesnému určení diagnózy a stádia nemoci. Dále přispívají k prognóze, která u forem akutní leukémie není optimistická.

Záměrem bakalářské práce je poskytnout přehled možných fúzních partnerů podílejících se na přestavbě genu MLL. Spolu s partnerskými fúzními geny představují nástup zhoubného onemocnění krvetvorného systému.

# 1 Gen

Jako první použil pojem gen roku 1909 dánský vědec Wilhelm Johansen. Gen tvoří základní informační jednotku dědičnosti, která spolu s funkční jednotkou obsahuje genetickou informaci o primární struktuře molekul. Jedná se o určitý úsek deoxyribonukleové kyseliny neboli DNA na chromozomu. Lidský genom, soubor všech genů v organismu se odhaduje na 30 – 40 tisíc genů [1,2].

Důležitou stavební i funkční složkou buněčných struktur jsou proteiny a ribonukleové kyseliny. Tyto kódující geny můžeme rozdělit do dvou základních skupin. Prvním typem je strukturální gen, který obsahuje informace o primární struktuře proteinů, popř. polypeptidů. K těmto genům patří geny kódující proteiny se stavební funkcí a geny kódující proteiny s biochemickou nebo fyziologickou funkcí. Druhou skupinu tvoří geny pro funkční ribonukleovou kyselinu neboli RNA, jejichž transkripční produkty nepodléhají translaci. Především se jedná o geny kódující transferovou RNA (tRNA) a ribozomální RNA (rRNA) [1, 2].

Gen obsahuje úseky zvané exony a introny. Exony a introny jsou sekvence nukleotidových kyselin, které se liší schopností kódování při syntéze proteinů. Tuto schopnost si zachovává pouze exon, u intronu dochází k odstranění uvnitř buněčného jádra.

Ke změně genetické informace neboli mutaci může dojít za určitých podmínek, které nejsme v jisté míře schopni ovlivnit. Jedná se tak o mutace, které jsou vyvolané zvýšeným působením některých chemických látek, fyzikálních faktorů a virů. Společně tyto faktory vedou k chemické změně struktury DNA, a jsou tak schopné vyvolat zlomy nebo jiné přestavby jejich molekul. Soubor těchto faktorů označujeme mutageny, jejichž následkem dochází k poškození genu. Změna genetické informace však nemusí mít za následek jen těžké vývojové vady, poruchy metabolismu či nádorové onemocnění, samotné mutace totiž i v některých případech přispívají k přežití a vývoji [2].

## 1.1 Gen MLL

Téměř před dvěma desítkami let byly získány první poznatky poskytující základní identifikaci genu MLL. Geny jsou označovány zkratkami tvořenými alespoň dvěma nebo častěji více písmeny. V našem případě se jedná o poruchu genu spojeného se vznikem určité nemoci a označení genu vychází z jejího názvu. V některých případech se zkratkové označení genu doplňují číslem. Nejčastější označení genu nese symbol **MLL** (**m**ixed **l**ineage or **m**ye-

loid/lymphoid leukemia), a proto se v této bakalářské práci budu držet tohoto pojmenování. Podle své buněčné funkce je nyní nazýván Lysin – specifická Methyl Transferáza 2A a označován symbolem KMT2A. Ve vědeckých databázích a odborných člancích se však můžeme setkat i s dalšími méně známými symboly – HRX, HTRX1, TRX1, ALL1, CXXC7 a WDSTS [3].

Může být také přezdíván jako gen lidského proteinu *Drosophila melanogaster*, tj. octomilka obecná. Jedná se o lidský protein, který spadá do rodiny proteinů – Trithorax group protein (TrxG), jejichž hlavním účinkem je udržení genové exprese. Expresí genu se rozumí proces, během kterého je genetická informace uložená v genu převedena do struktury proteinů [4, 5].

Gen MLL se nachází na dlouhém raménku 11. chromozomu s poškozením lokusu v oblasti 11q23. Zahrnuje 37 exonů a kóduje jaderný protein o délce 3969 aminokyselin s přibližnou velikostí 500 kDa [6, 7].

### 1.1.1 Struktura genu

Jak bylo již zmíněno výše, gen MLL je tvořen 37 exony a lokalizován na 11. chromozomu. Kóduje velký jaderný protein, který je shodný s proteinem *Drosophila trithorax*.

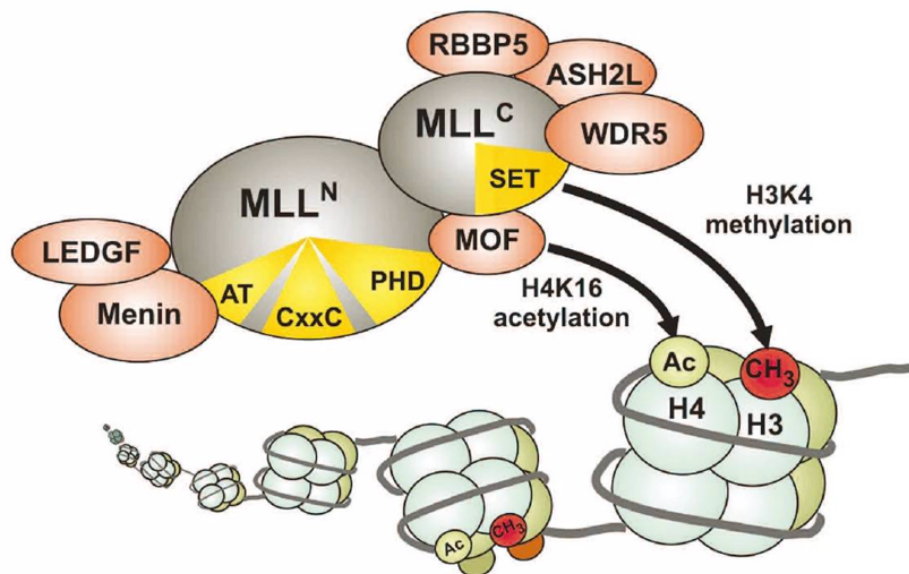
Protein MLL je tvořen funkčními doménami a vazebnými partnery. Pomocí specifické taspázy (Threonineaspartase 1) dochází k translačnímu štěpení jednotlivých aminokyselin proteinu MLL, jež je v konečné fázi sestřižen na dva fragmenty. Další funkcí této taspázy je udržení exprese HOX genů. HOX gen neboli homeotický gen je označení pro geny, jež mají významnou roli v průběhu embryonálního vývoje mnohobuněčných organismů. Jaderný protein je specifickou taspázou rozštěpen na větší N-koncovou část s velikostí 320 kDa a menší C-koncovou část s velikostí 180 kDa. Tyto dva proteinové fragmenty z genu MLL jsou sestaveny do důležitého proteinového komplexu s vysokou molekulovou hmotností. Obě části jsou nekovalentně vázány v dimer s umístěním v jádře, ve kterém působí jako regulační transkripční faktor [5, 9].

Struktura komplexu MLL je složitá a jednotlivé domény můžeme vidět na obrázku 1. N-koncová část proteinu MLL se skládá z domény pro protein Menin, růstového faktoru vázajícího chromatin, pojmenována LEDGF a tří domén – CxxC, PHD a AT- háčků. Vazebné místo pro jaderný protein – Menin, je na nejvzdálenějším místě a dále interaguje s LEDGF (PC4 and SFRS1 interacting protein 1). LEDGF či růstový faktor odvozený od epitelu oční čočky

obsahuje doménu PWWP, která má schopnost vázání na nukleozomy. Základní struktura nukleozomu je tvořena komplexem DNA a několika histony a obtočenými vlákny DNA. Dále se na N-koncové části nachází AT-háčkové motivy, které slouží pro navázání DNA přítomnou v proteinech. Jejich další funkcí je interakce mezi sebou, nebo s doménou CxxC (CXXC-type zinc finger protein 1). Ta se podobá motivu zinkového prstu a slouží jako senzor pro udržení metylace DNA. Jako poslední připojenou doménou této části MLL jsou 4 prsty cysteinové PHD doména (PHD fingers) [5, 8, 10, 13, 14].

Na C-koncovou část proteinu MLL je připojena doména SET a čtveřice proteinů MOF, RBBP5, ASH2L a WDR5. Tyto proteiny pomáhají k přípravě chromatinu na efektivní transkripci, tj. přepis genetické informace z molekuly DNA na molekulu RNA. Protein WDR5 (WD repeat-containing protein 5) působí jako spoj mezi proteiny RBP5, ASH2L a samotným MLL-C. Přítomnost mezi proteiny je však zanedbatelná, zatímco větší důraz je kladen na účast proteinu WDR5 u aktivity H3K4. Methylace histonů je kovalentní modifikace, která je zprostředkována histonovými methyltransferázami. Ty můžeme rozdělit do dvou skupin: protein arginin methyltransferázy a enzymy obsahující SET doménu, jejím úkolem je regulace genové aktivity. Methylací lysinu v pozici H3K4 vede k aktivaci transkripce. ASH2L (Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2) a RBP5 (Retinol Binding Protein 5) tvoří proteinový komplex, který je nezbytný pro účinnou aktivitu methyltransferázy a její přizpůsobení pomocí alosterické regulace. Tou se rozumí změna konformace enzymové molekuly, které jsou složeny z proteinů. Za nejdůležitější doménu celého komplexu se považuje doména SET, na které je celá methylace H3K4 závislá. Doména SET (Su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax) se nachází v mnoha proteinech a je shodná s doménou u proteinu *Drosophila trithorax*. Katalyzuje methyltransferázovou aktivitu na histony H3 v regionu HOX genů. Poslední připojenou doménou je protein MOF, který je schopný acetyltransferázy histonu 4 lysin 16 (H4K16). Jeho další funkcí je regulace chromatinu a kontrola buněčných procesů, jako je diferenciací T-buněk či poškození DNA [8, 9, 15, 16].

Fúzní geny si zachovávají doménu s AT – háčky a methyltransferázovou doménu, a naopak postrádají doménu SET, spolu s cysteinovou PHD doménou. V této sekvenci dochází k nahrazení translokačními partnery. Tato přestavba proteinu vede k přeskupení genu MLL a následnému vzniku leukémií [17].



Obrázek 1: Komplex MLL s funkčními doménami [51]

### 1.1.2 Molekulární podstata

Obohacujícím přínosem dnešní vědy je informace o mechanismu účinku způsobující mutaci genu MLL. Provedené experimenty zřetelně prokazují genetické narušení genu MLL. Ať už se jedná o samotné přeskupení genu, či fúzních alel, toto přeuspořádání genu MLL je dostačující, a nevyhnutelně tak spojeno se vznikem akutní myeloidní nebo akutní lymfoblastické leukémie.

Fúzní proteiny MLL spolu s partnerskými geny vytváří rozmanité fúze genu MLL. Příbuzné genové produkty poté spouštějí aberantní vývoj buněk. Protein divokého typu MLL se sestavuje do komplexu s transkripčními faktory, jehož následkem se označují sekvence DNA, které slouží k navázání RNA polymerázy a aktivaci transkripce. U diferencovaných buněk dochází k transkripci genu za vytvoření transkripčního paměťového systému, který je nezbytný pro udržení tkáňové identity linie stabilním způsobem.

Pomocí cytogenetické analýzy bylo doposud rozpoznáno přes 80 přímých fúzí genu MLL a přibližně 130 recipročních fúzí. Fúze genu vedou ke vzniku nových chimérických proteinů a genetické narušení genu MLL poté vede ke vzniku fúzních proteinů, které se vážou na jaderné proteiny LEDGF a MENIN v N – koncové části, kde způsobují transkripci mimo obvyklé místo genu a tyto změny vedou k přímým fúzím genu MLL. Reciproční fúze jsou naopak charakteristické PHD doménou, která je schopná methylace histonů. Oddělují také vazebné proteiny CREBBP a MOF, a vyznačují se napojením SET domény na C – koncové části [7, 11, 12].

Společným motivem těchto genetických změn, spojených s leukémií, je genetické narušení genu MLL. O nejčastějších fúzích genu MLL (MLL-AF4, MLL-AF5, MLL-AF9, MLL-AF10) je podrobněji pojednáno v další kapitole.

### 1.1.3 Funkce genu

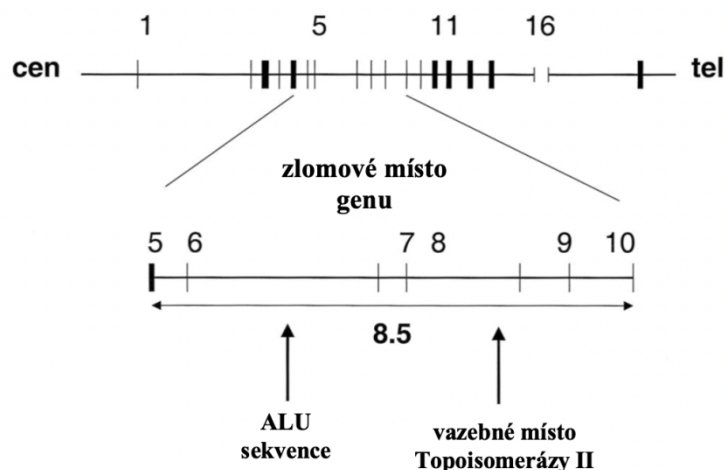
Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1., gen MLL je strukturně i funkčně shodný s proteinem trithorax *Drosophila melanogaster*. Tento protein se podílí na zachování genové exprese a epigenetické regulaci definovaných genů. Biologická funkce proteinu MLL vyplývá z aktivity histonové methyltransferázy domény SET [4].

Důležitou funkcí je kódování transkripčního koaktivátoru, který představuje zásadní úlohu v regulaci genové exprese během časného vývoje a hematopoézy. Kódovaný protein obsahuje více konzervovaných funkčních domén a udržuje správnou regulaci onkogenetických genů HOX. Specifické potlačení aktivity jediné alely genu MLL vyvolává změnu exprese genu HOX a zapříčiňuje poruchy myeloidního vývoje [5].

## 2 Přestavby genu MLL

Výskyt patologických nálezů genu MLL spočívá ve velkém počtu způsobů vzniku aberací. Z důvodu velkého množství fúzních partnerských genů s kódujícími proteiny dochází k nejrůznějším změnám genu MLL. Doposud všechny diagnostikované přesmyky MLL jsou spojovány s podobným fenotypovým onemocněním. Aberace genu MLL se vyskytují u akutních leukémií, které jsou většinou asociovány se špatnou prognózou. V závislosti vznikajících fenotypových změn můžeme mluvit o zařazení k chromozomovým mutacím neboli chromozomovým aberacím. Jedná se o mutační změny, které vedou ke zlomům a přestavbám struktury chromozomů [9].

Nejběžnější aberace u genu MLL jsou translokace, amplifikace a delece. V dalších případech byla popsána vlastní fúze dvou částí MLL genu. Jedná se o oblast bodového zlomu, která vede k částečné tandemové duplikaci, tj. přeskupení chromozomu v bezprostřední blízkosti. U amplifikační abnormality oblasti 11q23 bylo díky studii poukázáno na přítomnost více kopií genu MLL. K dalším kopiím genu MLL mohou vést numerické abnormality chromozomu 11, těmi mohou být trizomie, či tetrasomie. Reciproční genové fúze představují většinu stabilních přesmyků MLL. Dále bylo u pacientů s leukémií identifikováno množství dalších MLL aberací. Jedná se o genové vnitřní duplikace, inverze, delece, inzerce a komplexní přeskupení. Další možnou přestavbou je zlomové místo genu označováno MLL-bcr (the breakpoint cluster region), které je lokalizováno mezi exonem 5 a 11, uvnitř 8,5 kb regionu. U zlomového místa genu můžeme identifikovat připojení ALU sekvence v centromerické části, které jsou odpovědné za regulaci genu. Na druhé části je napojen topoizomerázový inhibitor, který se podílí taktéž na vzniku leukémií. Jedná se o připojení topoisomerázy II k vazebnému místu v telomerické části genu MLL. Topoizomeráza II (TOP 2) je enzym pozměňující sekundární strukturu DNA s přerušením obou vláken dvoušroubovice. Vlivem inhibice TOP 2 dochází k rozštěpení vlákna DNA, kde na volných koncích může docházet k rekombinaci mezi genem MLL a partnerským genem [9, 17].



Obrázek 2: Struktura exonů se zlomovým místem genu MLL [52]

## 2.1 Translokace genu

V současné době je zaznamenáno 82 chromozomálních translokací lidského genu MLL. Tyto translokace tvoří 5-10 % diagnostikovaných pacientů s akutní leukémií [7, 18].

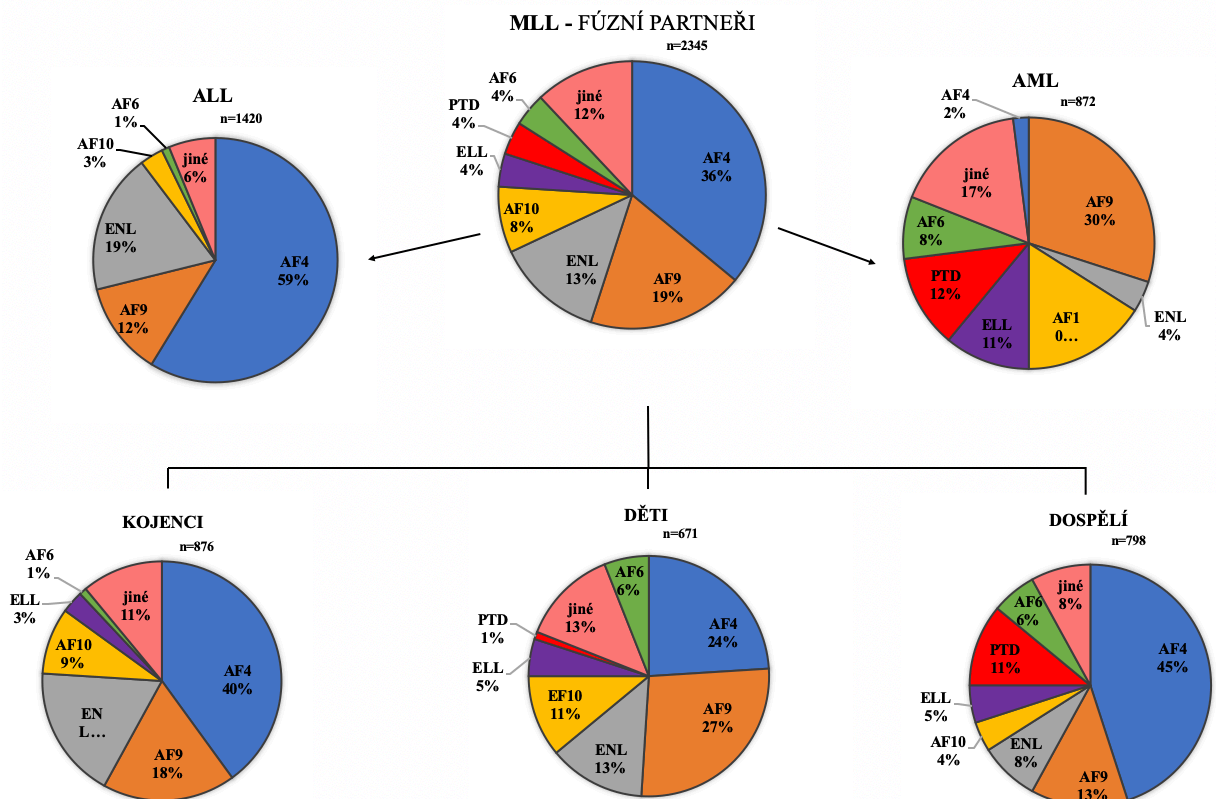
U translokací dochází k přesunu části jednoho chromozomu na jiný chromozom, či k vzájemné výměně genetického materiálu mezi dvěma různými chromozomy. Při přesunu sekven- ce jednoho chromozomu na jiný chromozom mluvíme o nereciproké translokaci a vzájemnou výměnu částí nehomologních chromozomů nazýváme reciproké translokace. Důsledkem translokace je vznik fúzního neboli chimérického genu, který produkuje fúzní protein s onkogenním potenciálem. Přestavbou dochází ke zlomu jednoho chromozomu, kde se od- dělí část protoonkogenu, který je translokací přemístěn a připojen k části genu-bcr na druhém chromozomu, ve kterém také došlo ke zlomu. Gen na přemístěném segmentu může fúzovat s jiným genem [7, 18].

Fúze genu MLL jsou založeny na genetickém přeskupení, jejichž vzniklé fúzní proteiny MLL jsou tvořeny N-koncovou doménou MLL a připojeným translokačním proteinem na C- konci. Výsledné chimérické geny jsou přepsány do „fúzních mRNA“ a následně převedeny do fúzních proteinů s onkogenním potenciálem. Přítomnost specifických fúzních genů je vždy spojena s konkrétním typem rakoviny [7, 12, 14, 19].

Zajímavostí v translokaci genu MLL je zapojení do transkripčního procesu ve fázi pro- dloužení. Jedná se o zapojení proteinů, které jsou buď přímo součástí super elongačních kom- plexů (SEC) nebo jsou proteiny přímo spojeny s RNA polymerázou II (RNAPII). Proteiny svou schopností omezují regulační zásah pomocí transkripční aktivity a způsobují rozsáhlé

epigenetické změny, které jsou vyvolány změnou v genové expresi bez změny nukleotidové sekvence DNA [7].

Vlastnost fúzních proteinů MLL je velmi rozmanitá a doposud bylo popsáno více než 135 partnerských genů pro možnou fúzi s genem MLL. K nejčastější fúzím genům MLL z pohledu diagnostikovaných případů u pacientů s akutní leukémií patří MLL-AF4, MLL-AF9, MLL-AF10 a MLL-ENL. Seznam ostatních opakujících se diagnostikovaných genů fúzních partnerů je dlouhý a zahrnuje mimo jiné MLLT5, MLLT11, MMLT6 a dalších přibližně 70 genů, které byly identifikovány a popsány v souvislosti vzniku fúzí MLL genu. Z pohledu klinického významu se však jedná o vzácné případy, a proto jejich klinické využití není potřebné. Všechny tyto fúzní geny však mohou přispět k získání nových poznatků u mechanismu rozvoje onemocnění či strukturách fúzních genů. Výšečové grafy jsou klasifikovány podle věkových skupin a typu onemocnění pacientů. Grafy jsou dále rozděleny na ALL (vlevo) a AML (vpravo). Celkový počet hodnocených pacientů byl 2345. Padesát tři pacientů nemohlo být klasifikováno do ALL nebo AML onemocnění. Dělení věkových skupin znázorňují grafy ve spodní části, ty jsou rozděleny do tří věkových kategorií na kojence, děti a dospělé. Data pro zpracování grafů byly převzaty z publikace roku 2017 [9, 20].



Obrázek 3: Grafické znázornění četnosti partnerských fúzních genů MLL [53]

## 2.2 Fúze genu MLL

Projevem fúzního genu je nejčastěji exprese fúzního proteinu s rozdílnými vlastnostmi. Fúzní geny si zachovávají doménu s AT-háčky a methyltransferázovou doménu. Naopak dochází ke ztrátě aktivační a SET domény. Právě v důsledku úbytku SET domény nemůže dojít k potřebné methylaci histonů a následkem je vyvolána porucha exprese genu HOX [9].

### 2.2.1 Fúze MLL-AF4

Nejrozšířenější genetickou aberací lidského genu MLL je chromozomální translokace t(4; 11)(q21; q23). Hlavní roli zde hraje protein AF4, který je translokací fúzován ke genu MLL. Onkogenní protein MLL-AF4 byl nalezen hlavně u akutní lymfoblastické leukémie (ALL) s typickými znaky B lymfocytů. Zřídka se translokace s tímto proteinem vyskytuje také u T lymfocytů ALL a akutní myeloidní leukémie (AML), kde se obvykle jedná o podskupinu M4 a M5. Zhruba 50 % diagnostikovaných případů akutní lymfoblastické leukémie s translokací t(4; 11)(q21; q23) je stanovena u dětí v kojeneckém období. Diagnostikovaných dospělých případů je 75 % u příčin vzniku akutní lymfoblastické leukémie [9].

Pacienti s translokací t(4;11)(q21; q23) se vyznačují agresivnějším průběhem leukémie a celkově špatnou prognózou.

Gen AF4 kóduje protein o velikosti 1210 aminokyselin a 140 kDa. Funkčně působí jako transkripční aktivátor v jádře. Charakteristické vlastnosti genu AF4 jsou sekvence bohaté na vysoký obsah serinu a prolinu, nukleární cílové sekvence a konsenzuální sekvenční vazba ATP/ GTP. Výsledný fúzní gen je typem 5' MLL-3' AF4 se zlomovými místy v oblasti za 354., 368. a 397. aminokyselinou. Získaný protein se skládá ze 1400 aminokyselin N-konce MLL a 850aminokyselin C-konce AF4. Velikost proteinu odpovídá 240 kDa [12].

### 2.2.2 Fúze MLL-AF6

Partnerským proteinem pro tento typ fúze je gen AF6. Jeho protein je lokalizovaný na t(6;11)(q27;q23) a obsahuje 1612 aminokyselin. AF6 protein působí v cytoplazmě jako partner pro transportní systém. Ke zlomu dochází za 35. aminokyselinou proteinu AF6. Výsledný fúzní protein je tvořen od N-konce MLL k C-konci AF6 a je složen z 1400 aminokyselin [12, 22].

Translokace t(6;11) představuje přibližně 5 % případů diagnostikovaných akutních leukémií s přeuspořádáním genu MLL. Častěji se vyskytuje u akutní myeloidní leukémie než u akutní lymfoblastické leukémie. Zejména se jedná o podskupiny akutní myelomonocytární a monocytární leukémie. Bylo prokázáno, že prognóza s fúzí genu MLL-AF6 má velmi špatné výsledky. Medián doby přežití je kolem 15 měsíců a řadí se k nejhorším diagnostikovaným případům akutní myeloidní leukémie [21].

### **2.2.3 Fúze MLL-AF9**

Druhým nejčastějším partnerem pro fúzi MLL je gen AF9, lokalizovaný na chromozomu 9. Fúze vzniká translokací v oblasti t(9;11)(p22;q23). Kóduje jaderný transkripční protein o velikosti 5 kb, obsahující 568 aminokyselin [9].

Výsledný fúzní gen 5'MLL-3'AF9 vzniká variabilním zlomem. Obvyklé místo fúzní oblasti u AF9 se nachází za 376 aminokyselinou, ale v pár případech se nacházelo v oblasti za 483 aminokyselinou. Fúzní protein obsahuje z proteinu MLL 1444 aminokyselin a z proteinu AF9 192 aminokyselin [12].

Fúzní gen MLL-AF9 je aktivně transkribován a výsledný fúzní protein podporuje expresi HOXA9 transkripčního faktoru, který byl spojen s leukemickou transformací. Gen AF9 se nejvíce seskupuje s MLL u akutní myeloidní leukémie. Nejčastěji se jedná o podskupinu akutní monocytární leukémie (M5), která se může vyskytovat v každém věku. Procentuální zastoupení u dětí je vyšší než u dospělých. Diagnostikování fúze genu MLL-AF9 je u dětí relativně častější a jedná se o 5 – 12 % AML. U dospělých pacientů se jedná o 2 % AML. Spolu s genem ENL mají velmi podobnou strukturu. Obsahují oblast cívky na C-koncové části s transkripční vlastností, která je nevyhnutelná a dostatečná ke vzniku leukemické transformaci v souvislosti s fúzí genu MLL [9].

### **2.2.4 Fúze MLL-AF10**

Gen AF10 byl prvním fúzním partnerem MLL, u kterého bylo prokázáno působení s proteinem DOT1L. Představuje zhruba 8 % případů leukémie s přestavbou genu MLL. Prognóza tohoto fúzního typu bývá opět špatná a nese riziko nálezů opětovných příznaků nemoci ve srovnání s jinými aberacemi 11q23. Fúzní protein genu AF10 se vyskytuje u akutní lymfoblastické leukémie s prekuzory T lymfocytů a akutní myeloidní leukémie u podskupin čas-

né myeloidní leukémie (M0), AML bez vyzrání (M1), akutní monocytární leukémie (M5) a akutní megakaryoblastické leukémie (M7) [5].

Gen AF10 je lokalizován v oblasti 10p12 a kóduje jaderný transkript o velikosti 5,5 kb. Protein obsahuje 1027 aminokyselin. Translokace tohoto genu s genem MLL je charakteristická rozmanitostí zlomových míst na chromozomu 10. Oblasti zlomu se vyskytují za 265, 642 a 680 aminokyselinou. Gen AF10 je transkripčně aktivní od telomery k centromere, a proto s genem MLL vytváří fúzní protein od N-konec MLL k C-konec AF10 [12, 23].

### **2.2.5 Fúze MLL-ENL**

Gen MLLT1, symbolem označován ENL (eleven nineteen leukemia), je lokalizován v oblasti 19p13.3. Kóduje protein o 559 aminokyselinách a jeho mediátorová RNA (mRNA) je o velikosti 4 kb. Působí opět jako transkripční faktor v jádře. Jak jsem zmínila u proteinu AF9, mají spolu s proteinem ENL velmi podobnou strukturu. Zlomové místo je nejčastěji lokalizováno za 4. aminokyselinou proteinu ENL. Vzniklý fúzní gen je typu 5'MLL-3'ENL [24, 25].

Translokace t(11;19)(q23;p13.3) představuje třetí nejčastější případ leukémie ve spojení s přestavbou genu MLL. Procentuální zastoupení je okolo 6 % diagnostikovaných případů ze všech MLL translokací. Přestavba byla pozorována u akutní myeloidní leukémie pod skupiny akutní myelomonocytární leukémie (M4) a akutní monocytární leukémie (M5), ale mimo jiné také u akutní lymfoblastické leukémie, bifenotypické leukémie a sekundární leukémie. Výskyt byl zaznamenán především u dětí mladších 1 roku. Jeho prognóza je velmi špatná, medián přežití je pod jeden rok [23].

U proteinu ENL a AF9 bylo prokázáno vzájemné působení s proteinem AF4. Dochází k interakci prostřednictvím C – konců. A můžeme tak říci, že dochází k vzniku komplexu obsahující protein AF4 s účinkem proteinu ENL ke snížení exprese genu HOX. Přesnější funkce spojení těchto proteinů, ale vyžaduje další zkoumání [4].

### **2.2.6 Fúze MLL-ELL**

Gen ELL (eleven nineteen lysin rich leukemia gene) je lokalizován v oblasti 19q13.1. Jeho jaderný protein obsahuje 621 aminokyselin o velikosti 68 kDa, sloužící jako transkripční

elongační faktor pro RNA polymerázu (RNAP). Vzniklý fúzní gen je typu 5'MLL-3'ELL [26].

Translokace t(11;19)(q23;p13.1) byla zachycena nejčastěji u akutní myelodní leukemie typu M4 a M5, a sekundárních akutních leukemií. Jedná se o typ s nejhorší prognózou. Častěji postihuje dospělé než děti. Medián přežití se pohybuje jen okolo 6 měsíců [26].

### 2.3 Amplifikace genu MLL

Následující možnou aberací genu MLL je zmnožení možné části chromozomu nebo nadpočetná kopie, vedoucí k produkci velkého množství proteinu MLL. Nadpočetná kopie genu je spojena s rozsáhlou změnou karyotypu. Amplifikace genu se vyskytuje v široké oblasti malignit, které vedou k nemístné aktivaci nebo amplifikaci exprese onkogenu. Aktivace onkogenů je tímto způsobem často spojována s agresivním růstem nádorů, a také s velmi špatnou prognózou. Umístění amplifikace onkogenů, za použití konvenční cytogenetické analýzy, může být lokalizováno třemi způsoby. Prvním je extrachromozomální double minutes, intrachromozomálně v homogenně zbarvených oblastech, anebo jako neidentifikovaný marker či derivovaný chromozom, chromozom kruhu nebo izochromozom. Cytogenetické detekování amplifikace genu AML je přibližně okolo 1 % [17].

Rozpoznání amplifikace genu MLL u akutní myelodní leukemie nepatří k častým. Dále se vyskytuje při myelodysplastickém syndromu a vzácně u B-lymfoblastické leukemie. V doposud hlášených případech byla amplifikace MLL často spojena se starším věkem, u komplexních změn karyotypu a velmi špatnou prognózou [18].

Amplifikace genu MLL u akutní myelodní leukemie (mj. také u myelodysplastickém syndromu) je spojeno s charakteristickými morfologickými nálezy, již zmiňovaném vysoce komplexním karyotypem, intravaskulární koagulopatií, agresivním průběhem a špatnou odpovědí na léčbu chemoterapií [17].

Dále byly pozorovány v souvislosti s amplifikací i nadpočetné kopie genu MLL. K dalším kopiím genu vedou numerické abnormality chromozomu 11, jako jsou trisomie nebo tetrasomie [20].

Hlavní rozdíl mezi amplifikací MLL a translokací MLL spočívá v tom, že první z nich má za následek zvýšení počtu kopií MLL nebo transkripční aktivity. Zatímco druhý způsobuje produkci nových chimérických proteinů s partnerskými geny.

## 2.4 Duplikace genu MLL

Dalším typem přesmyku MLL, který nelze detekovat klasickou cytogenetikou je duplikace genomové oblasti. Duplikace se vyznačuje přítomností nadbytečných chromozomových segmentů a patří ke strukturním aberacím chromozomů. U genu MLL se přesněji jedná o částečnou tandemovou duplikaci, zkráceně MLL – PTD. Duplikované genomové oblasti zahrnují exony MLL 5 až 11 nebo exony MLL 5 až 12, které jsou vloženy do intronu 4 genu plné délky MLL, čímž dochází k fúzi intronů 11 nebo 12 s intronem 4. Následkem je jedinečná fúze exonů 11 nebo 12 v protisměru exonu 5 [21,22].

MLLPTD je detekována přibližně v 5-10 % případech akutní myelodní leukémie a v případech s normálním karyotypem, přináší horší prognózy. Nejčastější přítomnost MLL PTD byla prokázána u dospělých de novo AML s normální cytogenetikou nebo trisomie 11. Také byla pozorována u dětských pacientů s AML, u dospělých ALL, sekundární leukemie a nádorových transformací buněk. U dospělých de novo AML s normálním karyotypem byla přítomnost MLL PTD spojena s horší prognózou (tj. kratší trvání remise) ve srovnání s normálním karyotypem AML bez MLL PTD [22].

## 2.5 Delece genu MLL

Deleci genu označujeme jako ztrátu části chromozomu. Rozlišení delecí genů je velmi těžké a pomocí pruhovací metody je možné detekovat velké delece v mitotickém dělení, u malých delecí je tato detekce nemožná. Delece doprovázejí řadu chromozomálních translokací v několika případech akutní leukemie. Nejčastěji postihuje exon 8 genu MLL. Četnost delece genu MLL se pohybuje v rozmezí okolo 8 % až 28 %. Procentuální zastoupení zahrnuje AML i ALL, a pacienty všech věkových kategorií [19].

### 3 Význam přestaveb genu MLL u leukémií

Chromozomální translokace genu MLL a jejich fúze MLL s partnerskými geny spouštějí aberantní samoobnovení hematopoetických progenitorů vedoucí k akutní leukémii. Přestavby genu MLL u akutní leukemie jsou charakteristické pro akutní myelodní leukemie (AML) a akutní lymfoblastické leukémie (ALL). Přestavba genu MLL představuje 5-10 % všech případů. Neobvyklé biologické a klinické vlastnosti spojené s translokacemi MLL mají velmi špatnou prognózu a z tohoto důvodu je vyložena snaha ke zlepšení terapeutické strategie.

Výskyt agresivní rakoviny krve je převážně u pediatrických pacientů. Abnormalita se vyskytuje až u 70 % dětí ALL a přibližně u 10 % všech ostatních případů ALL. Konkrétní skupinu pacientů charakterizující tzv. „MLL fúze“ představují asi 5-10% všech případů akutní leukémie u dětí a dospělých.

#### 3.1 Akutní leukémie

Leukémie je zhoubné onemocnění krvetvorného systému. Jedná se o onemocnění leukocytů. Podstatou nádorového bujení je chromozomální aberace jedné kmenové buňky kostní dřevě v různém stupni vývoje a zralosti. Vzniklé poškození se přenáší do dalších buněčných generací a dochází k nekontrolovatelné proliferaci maligních buněk. Nadprodukce vede k jejich hromadění v kostní dřevě a potlačení fyziologické tvorby krevních buněk [30, 31].

Prvním průkopníkem v oblasti leukemií byl německý lékař Rudolf Virchow, jenž pojmenoval onemocnění krvetvorné tkáně slovem leukemie a roku 1847 termín leukémie poprvé použil. Slovo leukémie vzniklo spojením dvou řeckých slov „leukos“ a „haima“, což v doslovném překladu do českého jazyka znamená „bílá krev“ nebo bělokrevnost [28, 34].

Příčina vzniku leukemií není známá. K maligní transformaci tohoto onemocnění vedou některé predispoziční účinky. Mezi tyto faktory patří ionizující záření, předchozí léčba cytostatiky či jiné užívání léků, chemické látky (benzen, toluen), viry (jeden typ leukémie z T lymfocytů) či translokace genů. Zvýšený výskyt je zaznamenán u genetických abnormalit. Příkladem je trizomie 21. chromozomu, tj. u Downova syndromu [30, 34].

Leukemie lze rozdělit na akutní a chronické formy. Akutní formy jsou charakterizovány rychlým nárůstem nezralých krvinek, tzv. maligní transformací mladých krvetvorných buněk. Tento typ se častěji objevuje u dětí. Chronické formy vznikají nadměrným shromážděním maligních zralých krvinek a vyskytují se především u lidí ve starším věku [28].

Podle typu postižení buněk můžeme leukemie dále rozdělit na myeloidní a lymfatické.

Rozdělení leukémií:

- Akutní myeloidní leukémie (AML)
- Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)
- Chronická myeloidní leukémie (CML)
- Chronická lymfatická leukémie (CLL)

**Akutní leukémie** se vyznačují nekontrolovatelnou proliferací leukemických blastů v kostní dřeni. Jedná se skupinu nádorového onemocnění krvetvorby z krvetvorné hematopoetické kmenové buňky. Akutní leukémie můžeme rozdělit dle příslušnosti blastů k myelodní či lymfoidní linii. Podrobnější rozložení je založeno na hodnocení imunofenotypu, cytogenetických změn a molekulárně genetické podstatě blastů. Průběh akutní leukémie je velmi rychlý a bez včasné léčby může osoba trpící tímto onemocněním zemřít téměř ihned [28].

K léčbě se používají chemoterapie nebo transplantace krvetvorných kmenových buněk.

### 3.1.1 Akutní myelodní leukémie

Akutní myelodní leukémie (AML) je heterogenní maligní onemocnění hematopoézy, charakterizované vznikající nekontrolovatelnou proliferací a akumulací nezralých myeloidních prekurzorů v kostní dřeni. Za zhoubné buňky jsou označovány myeloblasty, což jsou nevyvinuté bílé krvinky. Při normální krvetvorbě jsou tyto buňky nezralými prekurzory myeloidních bílých krvinek, které postupně vyžívají do zralých bílých krvinek. U AML dochází v myeloblastech k hromadění genetických změn, které zabraňují její diferenciaci a nedochází k správnému dozrání buněk. Samotná mutace není příčinou leukémie, ale toto zastavení diferenciace ve spojení s dalšími mutacemi způsobujícími přerušování proliferace má za následek spontánní vznik nezralých buněk, které jsou podstatou AML [32, 33].

Dle definice se jedná o expanzi myeloblastu tvořící více jak 20 % jaderných buněk v kostní dřeni. Vysoký počet bílých krvinek v periferní krvi však není podmínkou, v některých případech je počet normální, někdy zas velmi snížený [33].

AML je častěji pozorována u starších lidí a může být rozdělena do dvou podtypů. Prvním je AML de novo, které nevzniká z předchozí působení chemoterapeutik. Ale pokud se účinek

chemoterapeutik podílí na vznik jedná se o sekundární AML, která se vyskytuje po předchozí chemoterapeutické léčbě. Jedná se o léčbu inhibítorem topoizomerázou II, která se nejčastěji vyskytuje u podskupin akutních forem myelomonocytární a monocytární leukémie. Procentuální zastoupení všech leukemií u dospělých je až 80 %. Postihuje především jedince ve starším věku nad 65 let. Rozhodně však není vyloučený výskyt u dětí, kde se jedná přibližně o 15 % všech leukemií [36].

### **Klasifikace**

V roce 2016 Světová zdravotnická organizace (WHO) upřesnila rozdělení podskupin AML, které navrhla roku 2004. Jedná se o rozdělení na principu cytogenetické a molekulárně genetické podskupiny zahrnující genové mutace, fúzní geny a mnoho dalších nových poznatků. Přesto je v dnešní době upřednostňováno rozdělení z roku 1976, které navrhla "French-American-British cooperative group", zkráceně FAB [35, 36].

Podle FAB rozdělujeme AML do těchto podskupin:

M0 – AML bez diferenciac (časná myeloidní leukémie)

M1 – AML bez vyzrání

M2 – AML s vyzráním

M3 – Akutní promyelocytární leukémie

M4 – Akutní myelomonocytární leukémie

M5 – Akutní monocytární leukémie

M6 – Akutní erytroleukémie

M7 – Akutní megakaryoblastická leukémie

## Diagnostika

Standartní diagnostické postupy v současné době zahrnují morfologické hodnocení nátěru periferní krve či kostní dřeně, analýzu povrchových a cytoplazmatických markerů pomocí průtokové cytometrie, tj. imunofenotypizace, ale také identifikaci chromozomálních změn pomocí metody FISH [32].

Ke stanovení diagnózy se v krevním obraze pozorují blasty bez vývojových stadií granulocytů, anémie, trombocytopenie, leukopenie, leukocytóza či normální počet leukocytů. Imunofenotypizační vyšetření prováděné metodou průtokové cytometrie slouží ke stanovení konkrétních epitopů v cytoplazmě a na membráně blastů. Toto vyšetření je nutné k diagnóze M0 a M7, a v případech odlišení AML od ALL. Molekulárně cytogenetické vyšetření odhalují početní a strukturní odchylky chromozomů. Stanovují přítomnost fúzních genu a případných mutací [28, 37].

Celkem bylo popsáno okolo 749 translokací spojených s AML. Mezi nejčastější patří t(8;21), t(15,17), inv(16) a 11q23, MLL [39].

Translokace t(8;21)(q22;q22) vzniká mezi genem ETO chromozomu 8 a AML1 chromozomu 21. Vzniká gen AML1/ETO s funkcí transkripčního faktoru pro AML. Tato translokace představuje přibližně 10 % všech AML. Nejčastěji se vyskytuje u typu M2 a je spojen s příznivou prognózou [39].

Translokací t(15;17)(q22;q21) vzniká fúzní gen PML-RAR $\alpha$ , jehož výskyt je nejčastěji u akutní promyelocytární leukémie. Vyznačuje se zástavou vývojové linie na úrovni promyelocytů a je detekována ve středním věku u 7 až 15 % všech AML. Akutní promyelocytární leukémie patří k nejsnáze léčitelné formě akutní leukémie u dospělých [39].

Inverze (16)(p13;q22) vzniká pouze na jediném chromozomu 16. Dochází k výměně genu MYH11 z p13 a genu CBD $\beta$  z q22. Tento typ mutace se nachází přibližně v 8 případech AML, především u podskupiny myelomonocytární leukémie (M4) [39].

Mezi poslední námi již známou translokací patří abnormalita 11q23. Přestavba genu MLL se podílí na 10 % AML. Prognóza s tímto typem translokace patří mezi nejhorší [39].

### **Prognóza a terapie**

Postup léčby a prognóza u AML se odvíjí od zařazení do skupiny cytogeneticko – molekulárního rizika. Zařazení se určuje podle výsledků z výše vypsanych vyšetření. Jedním z hlavních ukazatelů jsou zmíněné translokace [37].

Nejčastěji zvolenou léčbou je zahájení intenzivní indukční chemoterapie. Při možném relapsu nemoci je vyžadována alogenní transplantace kostní dřeně. Prognóza starších pacientů je, i přes možné podstoupení intenzivní chemoterapie, špatná. A proto se u starších pacientů léčí pouze paliativní chemoterapií. Cílem je udržet pacienta na určité úrovni kvality života [28].

### **3.1.2 Akutní lymfoblastická leukemie**

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je maligní onemocnění krvetvorby, které vzniká změnami kmenových buněk. K maligní transformaci dochází na úrovni nezralých lymfoidních buněk, tzv. lymfoblastů. Charakteristikou ALL je zvýšená tvorba a neustálé množení lymfoblastů v kostní dřeni, které znemožňují normální funkčnost krvinek. Brání vzniku normálních buněk v kostní dřeni, což vede k nedostatku červených destiček a normálních bílých krvinek v krvi [28, 29].

Nádorové buňky, které jsou přeměněny ze zdravých buněk změnou genu, ztrácí schopnost vyzrávání a nekontrolovatelného zmnožení. Přesný mechanismus vzniku ALL, ať už se jedná o genové či chromosomové odchylky není dosud přesně znám. K diagnostikování a konkrétní klasifikaci ALL je nutné vyšetření krevního obrazu s diferenciatním rozpočtem bílých krvinek a vzorku kostní dřeně. Pomocí cytogenetického a FISH vyšetření je možné rozdělit ALL do dvou hlavních podskupin. Jedná se o rozdělení na základě přítomnosti typických znaků pro jednotlivé T a B lymfocyty na povrchu nádorových buněk. První podskupinou je B – prekursorová leukémie (B-ALL), která představuje 75 % všech diagnostikovaných ALL. Druhou podskupinou je T – prekursorová leukémie (T-ALL), která představuje 25 % všech diagnostikovaných ALL [28, 29].

ALL představuje nejčastější nádorové onemocnění u dětí a je zaznamenána u 80 % všech dětských leukémií. Vrchol incidence je mezi 2. a 5. rokem věku dítěte. V dospělosti představuje ALL jen 20 % akutních leukémií a 1 % všech nádorových onemocnění [28].

Ke vzniku akutní lymfoblastické leukemie přispívá ionizující záření, kouření, léky, chemické látky a vyšší sklon opět představují vrozené choroby. Mezi ty se řadí Downův syndrom či Fanconiho anémie.

### **Klasifikace**

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) se ALL dělí podle příslušnosti B-lymfocytů a T-lymfocytů ve vývojové linii. Klasifikace je založena na mikroskopickém, cytogenetickém a molekulárně cytogenetickém vyšetření leukemických buněk. V klasifikačním systému lymfoblastické leukémie z B buněk jsou dále leukémie rozdělovány do skupin podle rekurentních genetických abnormalit. Jedná se o B-ALL s přítomností fúzního genu BCR-ABL, kde dochází k translokaci mezi chromozomem 9 a 22. Dále je to B-ALL s přestavbou genu MLL (KMT2A) u translokace chromozomu 11. B-ALL s translokací chromozomů 12 a 21. B-ALL se zvýšeným či sníženým počtem chromozomů [28].

Další možnou klasifikací ALL je podle Evropské skupiny pro imunologickou klasifikaci leukémií (European Group for the Immunological Characterization; EGIL). Princip je založen podle imunofenotypu maligních buněk, které by měli odpovídat přibližnému stupni zralosti lymfoblastů. K vyšetření imunologických vlastností leukemických buněk se používá metoda průtokové cytometrie.

Proliferace a diferenciací buněk vzniká v kostní dřeni a cévami se šíří do všech orgánů a tkání.

### **Diagnostika**

Mezi nejdůležitější vyšetření sloužící ke stanovení fenotypu blastů patří průtoková cytometrie neboli Imunofenotypizační vyšetření. Za jeho pomoci lze určit podtyp ALL, prognózu a následně druh léčby. Diagnóza ALL je potvrzena při přítomnosti více než 20 % nezralých lymfoblastů. Za pomoci molekulární genetiky dochází k identifikaci genových mutací nebo dalších změn v počtu či struktuře chromozomů [28, 40].

Důležitými genetickými změnami zapříčiňující vznik ALL jsou  $t(1;19)(q23;p13)$ ,  $t(4;11)(q21;q23)$ ,  $t(9;22)(q34;q11)$  a  $t(12;21)(p12;q22)$ . Tyto přestavby jsou doprovázeny velmi špatnou prognózou [32].

Translokací t(1;19)(q23;13) vzniká fúzní gen E2A-PBX. Vyskytuje se přibližně u 6 % dětí s ALL. V minulosti byla tato translokace považována za prognosticky nepříznivou, ale díky moderní terapeutické léčbě jsou výsledky bez rizikových faktorů [38].

Translokace t(4;11)(q21;q23) je produktem fúzního genu vznikajícího translokací genu AF4 z chromozomu 4 a genu MLL z chromozomu 11. Tato translokace byla detekována u 75 % případů ALL dětských pacientů [38].

Translokace t(9;22)(q34;q11) se odehrává mezi chromozomem 9 v místě, kde se nachází gen ABL a chromozomem 22 v místě, kde se nachází gen BCR. Tato translokace za vzniku filadelfského chromozomu patří ke speciálnímu typu ALL. V případě ALL je vzniklý fúzní gen BCR-ABL nejčastější detekovatelnou abnormalitou u dospělých ve starším věku. Z terapeutického hlediska patří BCR-ABL k nejobtížněji léčitelnou ALL a vyznačuje se špatnou odpovědí na chemoterapeutickou léčbu [38].

Translokace t(12;21)(p12;q22) je nejčastější genetickou abnormalitou u ALL. Vyskytuje se až u 25 % dětských ALL. Vzniklý fúzní gen TEL/AML1 je prekurzorem B-lymfatické řady. Z prognostického pohledu se jedná o formu leukemie s velmi příznivou šancí na vyléčení [36].

### **Prognóza a terapie**

Prognóza ALL se odvíjí od věku pacienta, rizikových faktorů, typu léčby a možných komplikací. Stanovení prognózy je určeno dle zařazení do rizikových skupin. Zatímco prognóza u dětí je velmi dobrá a ALL může být vyléčena, u kojenců a dospělých tomu tak není. Přibližně u 35 % dochází k remisi [28, 32].

Onemocnění se poměrně rychle šíří krví do životně důležitých orgánů, a proto je nutné zahájit včasnou a vhodnou léčbu, pro kterou je nutné zohlednit několik faktorů. Cílem léčby je obnovení normální funkce kostní dřeně a zničení leukemických buněk v těle. K nejčastější základní léčbě ALL patří chemoterapie, tedy léčba chemickými látkami.

## 4 Metody detekce přestaveb genu MLL

Detekce aberací genu MLL u AML/ALL je velice důležitá, a to především kvůli nepříznivým prognózám spojených s touto nemocí. Klasická analýza karyotypu neodhalí všechny translokace genu MLL, a proto se k detekci spíše využívají molekulárně cytogenetické metody.

### 4.1 Analýza karyotypu

#### 4.1.1 Lidský karyotyp

Základem buněčného dělení je dělení jádra. Jádro mateřské buňky se rozpadá na vláknité útvary, které se dělí a vytvářejí dvě dceřiná jádra. Vlákňitý útvar, nesoucí deoxyribonukleovou kyselinu tzv. DNA, histony a specifické proteiny, se nazývá chromozom. Chromozom je rozdělen centromerou na dvě chromatidy – raménka, pojmenována p a q. Raménko p pro kratší a q raménko naopak pro delší. Centromera je oblast spojení chromatid v chromozom. Podle polohy centromery můžeme rozdělit chromozomy na metacentrické, submetacentrické a akrocentrické. Centromera u metacentrických chromozomů je uprostřed a raménka p a q jsou přibližně stejně dlouhá. U submetacentrického typu centromera rozděluje chromozom na krátká a dlouhá raménka. Centromera u akrocentrických chromozomů je na konci chromozomu a p-raménka jsou viditelně velmi krátká [2, 48].

Karyotyp je soubor všech chromozomů v jádře jedné buňky s označením jejich počtu, druhu pohlavních chromozomů a případných chromozomálních aberací. Lidský karyotyp je tvořen 46 chromozomy, z nichž 22 párů nepatří mezi pohlavní chromozomy a jsou nazývány autozómy. Dále je v karyotypu přítomen vždy jeden chromozom maternálního a druhý paternálního původu. Chromozomy jsou označovány arabskými číslicemi od 1 do 22 a při vyšetření jsou seřazeny od největšího po nejmenší. Zbývající pár je pár pohlavních chromozomů (tzv. gonozomy), s označením X a Y. U žen jsou to dva pohlavní chromozomy X a u mužů je to jeden chromozom X a jeden chromozom Y [31,47].

Normálního karyotypu žen je zapisován jako 46,XX a mužů 46,XY.

#### 4.1.2 Vyšetření karyotypu

Vyšetření karyotypu patří v dnešní době k vysoce propracovaným metodám. Cílem je vyloučení numerických či chromozomálních aberací. Jedná se o vyšetření provedené pomocí

barvení Giemsovým barvivem, které nám umožní diferenciaci a podrobnou orientaci v jednotlivém chromozomu. K vyšetření karyotypu se nejčastěji používají mitotické buňky, které byly zastaveny v metafázi, popřípadě prometáfazi, buněčného cyklu. Jako zdroj buněk lze použít různé typy tkání. Pečlivá analýza karyotypů může odhalit diagnostické informace pro specifické vrozené vady, genetické poruchy nebo dokonce i rakoviny. Nejčastěji se diagnózy karyotypu vytvářejí ze vzorků periferní krve či biopsie kůže. Pro diagnózu rakoviny jsou typickými vzorky nádorové biopsie nebo vzorky kostní dřeně. V prenatálním období se pro diagnostiku odebírá plodová voda nebo vzorky choriových klků [45].

Metoda proužkování chromozomů umožňuje identifikaci chromozomů, sestavení karyotypu, a především odhalení drobných či komplexních změn chromozomů. K metodám barvení chromozomu se využívá G-pruhování, Q-pruhování, C-pruhování či barvení koloidním stříbrem.

Nejvyužívanější metoda v cytogenetických laboratořích je G-pruhování. Nejdříve jsou chromozomy vystaveny účinku trypsinu, který denaturuje chromozomální protein, a následně jsou dobarveny Giemsovým barvivem. Pro každý lidský chromozomový pár vznikne charakteristický tmavý heterochromatinový a světlý euchromatinový pruh chromatinu. Kromě světlých a tmavých pruhů se dále hodnotí velikost chromozomů a jejich tvar s polohou centromery [31, 45, 46].

Další možností pro stanovení je Q-pruhování. Chromozomy se barví pomocí fluorescenčního barviva Chinakrin (ang. Quinacrine), které se naváže na nukleové báze, a to zejména na bohatou oblast s adeninem a thyminem. Světlé a tmavé Q-pruhy přibližně odpovídají G-pruhům. Nevýhodou je následné vyhodnocení pomocí speciálního fluorescenčního mikroskopu a při delší expozici UV světlem fluorescence chromozomu u Q-pruhování slábne. U R-pruhování jsou preparáty, před obarvením Giemsovým barvivem, vystaveny tepelnému zahřátí. Výsledné pruhy jsou opačné ke G-pruhům [31, 45, 46].

C-pruhování je metoda, která se používá k vizualizaci konstitutivního heterochromatinu. Na obarvení se používá hydroxid barnatý a k dobarvení Giemsovův roztok. Poslední metodou je barvení koloidním stříbrem, kde dochází ke zvýraznění p-raménka akrocentrických chromozomů [31, 45, 46].

K vyhodnocení se používají počítačové analýzy, které po nasnímání obrazu do počítače následně sestaví karyotyp. Poté je možné prostudovat strukturu jednotlivých chromozomů, jejich rozdělení a seřazení. Sestavení karyotypu je také možné, i bez pomoci počítačového zařízení, za pomoci mikroskopu [46].

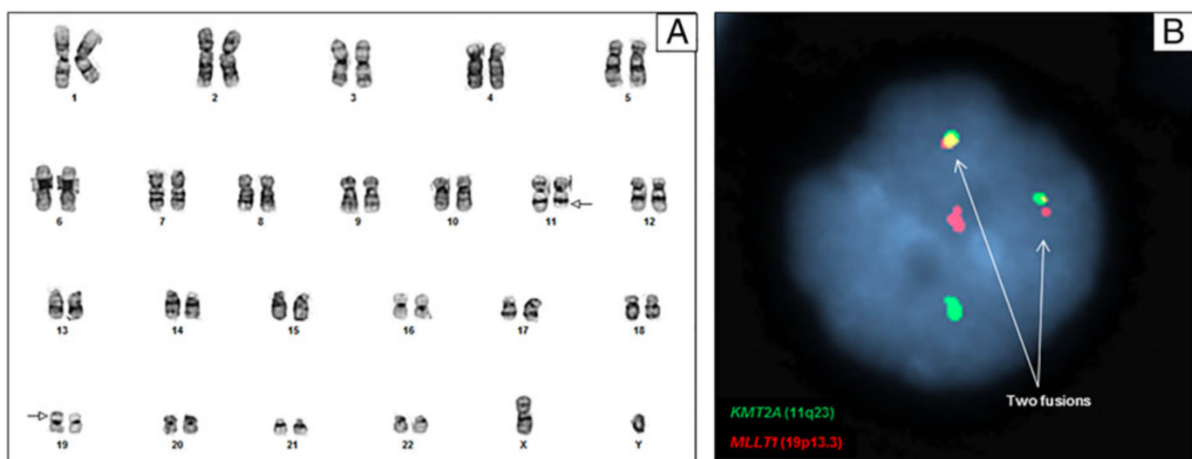
## 4.2 Fluorescenční hybridizace in situ

Fluorescenční hybridizace in situ neboli FISH, patří ke standardním cytogenetickým vyšetřením, která poskytují přesnou lokalizaci a identifikaci specifických úseků nukleových kyselin v DNA, u kterých může docházet k delecí, zmnožení či translokaci DNA úseků. Metoda FISH umožňuje pohotovou a přesnou detekci počtu kopií chromozomů, genů či jednotlivých úseků DNA, počtu translokací a mikrolecí. Vyšetřovanými vzorky mohou být metafázní chromozomy, interfázní jádra, ale i celé buňky [42].

Principiálně se jedná o navázání fluorescenčního barviva na DNA ve vzorku, a to pomocí značené jednovláknové DNA s fluorescenční značkou (fluorochromy) – tzv. sondou. Při zvýšené teplotě 72-75 °C dochází k rozvolnění vláken DNA sondy a vyšetřovaného vzorku, po následném ochlazení na 37 °C se sonda specificky naváže na vyšetřovaný úsek DNA s komplementární sekvencí. Hybridizace probíhá přímo v biologickém materiálu, nikoliv na izolované DNA. Podle místa navázání sondy na chromozom rozlišujeme čtyři typy DNA sond. Na střední části chromozomu jsou využívány sondy centromerické, na konkrétní místo genu se používají lokus specifické sondy, subtelomerické sondy se navazují na koncové části chromozomů a posledním typem jsou sondy s fluorescenčním nabarvením celých chromozomů [2, 42].

Moderní modifikací fluorescenční in situ hybridizace je vícebarevná FISH neboli M-FIS, umožňuje odlišení všech chromozomů v lidském karyotypu pomocí sond značených různými fluorescenčními barvivy [2, 42].

Výsledný signál po navázání sondy je detekován ve fluorescenčním mikroskopu.



Obrázek 4: A - karyotyp s translokací 11;19, B – FISH s dvěma fúzními signály genu *MLL/ENL* [54]

### 4.3 Polymerázová řetězová reakce

Velký význam molekulárně biologické vědě přináší metoda PCR neboli polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction; PCR), která slouží ke zmožení specifických úseků DNA. Tento enzymatický proces je schopný replikovat úsek DNA za vzniku mnoha kopií dané sekvence. K analýze reakční směsi lze využít velmi malé množství templátové DNA, která byla izolována ze vzorku, dva primery komplementární s vlákny jedno řetězové DNA, dále je to směs nukleotidů dNTP a termostabilní DNA polymerázu pro amplifikaci specifické oblasti DNA [49].

Polymerázová řetězová reakce probíhá v přístroji zvaném termocykler (teplotní cyklery). V přístroji probíhají teplotní cykly, které jsou nutné k průběhu reakcí. Dochází ke zvyšování či snižování teploty během několika sekund. Celý proces metody PCR se skládá ze tří reakcí – denaturace, hybridizace primerů a elongace nukleotidových řetězců. Všechny cyklické fáze jsou teplotně odlišné a dochází k syntéze miliónů kopií určité sekvence DNA [2, 49].

V počáteční fázi dochází k denaturaci templátu vyšetřované DNA za působení zvýšené teploty na 92-96 °C. Dochází k rozdělení vodíkových vazeb mezi dusíkatými bázemi a z dvoušroubovice se stávají dvě samostatná vlákna DNA. Doba trvání denaturační fáze se většinou pohybuje v rozmezí 10-60 sekund. Poté termocykler snižuje teplotu na 45-60°C. Dochází ke komplementárnímu navázání primerů na cílové sekvence vyšetřované DNA. Tuto fázi můžeme nazvat anelační a obvykle trvá 30-60 sekund. Ve třetí fázi dochází působením DNA polymerázy k prodlužování neboli elongaci nukleotidových řetězců. DNA polymeráza se naváže na 3'-konce každého primeru a za použité jednovláknové DNA jako templátu připojuje nové nukleotidy ve směru 5'-3'konce. Nejčastěji používanou DNA polymerázou je Taq polymeráza, která je izolována z bakterie *Thermus aquaticus* a svým přizpůsobením vysokým teplotám odolává denaturaci mnohem lépe než běžně využívané bakteriální DNA polymerázy. Teplota v této fázi je v termocykleru lehce zvýšena na 70 °C a trvá obvykle 60 sekund. Pomocí volných stavebních kamenů deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP) dochází k syntéze nového komplementárního řetězce. Pro vytvoření dostatečného množství se cyklus musí několikrát opakovat. Každý základní cyklus se podle potřeby obvykle opakuje 30 až 60krát [2, 49].

Vzniklý amplifikovaný produkt, metodou PCR, se detekuje pomocí gelové elektroforézy. Principem elektroforézy je separace, která pracuje na základě rozdílné hmotnosti separace,

kde se produkt oddělí od zbytků DNA. K výrobě elektroforetického nosiče se nejčastěji využívá gel, který se vyrábí z polysacharidu agaróza nebo polyakrylamidu. Hlavním principem je pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Aparatura k provedení elektroforézy je zapojena ke zdroji stejnosměrného proudu a produkty vždy putují od katody směrem k anodě. K tomu dochází na základě záporně nabitě nukleové kyselině. Rychlost pohybu závisí na velikosti fragmentů. Platí však, že kratší fragmenty se pohybují rychleji než delší fragmenty. Pro vizualizaci PCR produktu gelovou elektroforézou se k obarvení přidává barvivo, např. SYBR green, které se naváže na fragment DNA a pomocí UV světla ho zviditelní [2, 50].

### 4.3.1 RT-PCR

RT-PCR neboli reverzní transkriptázová PCR je modifikací klasické metody PCR, která slouží k detekci a kvantifikaci mRNA. Samotná RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR, a proto musí být RNA nejdříve převedena na cDNA. Pomocí enzymu reverzní transkriptázy, která používá mRNA templát, dochází k produkci komplementárního jednovláknové DNA řetězce cDNA. K přeměně jednovláknové cDNA na dvouvláknovou DNA se poté použije DNA polymeráza. Vzniklé molekuly DNA mohou být dále využity pro klasické stanovení metodou PCR [43].

U aberantních chromozomů se častěji provádí detekce na úrovni RNA než DNA. Důvodem je časová náročnost stanovení na základě DNA. Rychlé a přesné určení hladin mRNA ve vzorcích se běžně používá u identifikací aberantních onkogenů fúzních produktů. Příkladem stanovení je translokace či molekulární remise s akutní promyelocytární leukémií. Kompletní molekulární remise je stav, kdy pomocí RT-PCR nelze detekovat nádorové buňky v krvi, kostní dřeni nebo lymfatické uzlině. Dosažení tohoto stavu u pacientů s leukémií je mimořádné měřítko prognózy nad klinickým hodnocením remise, které je založeno na klinickém vyšetření, zobrazovacích technikách a histologických či cytologických vyšetřeních [44].

Metoda RT-PCR je velice citlivá a je schopná identifikace konkrétního fúzního genu a přesná místa jejich zlomů. Její použití se upřednostňuje ke studiu genové exprese a k identifikaci intronů a exonů.

### 4.3.2 Real time PCR

Základní modifikací klasické PCR je metoda real time PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase (rtPCR). Tato metoda umožňuje změření zmnoženého produktu v průběhu času. Právě díky časté detekci, která je rychlá a přesná, je možné zaznamenávat dílčí přírůstky

DNA, a to bezprostředně po jejich vzniku během jednotlivých cyklů. Tyto cykly se moc neliší od cyklů klasické PCR. Hlavní rozdíl je ve složení reakčních komponentů směsi a v detekci pomocí techniky fluorescence. Pro kvantitativní detekci produktu v průběhu rtPCR jsou známy tři obecné metody založené na použití fluorescenčního barviva, fluorescenčně značených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu nebo fluorescenčně značené primery pro detekci narůstajícího množství produktu. Tyto komponenty jsou v reakční směsi rtPCR, na rozdíl od klasické PCR navíc [50, 51].

Nejjednodušší vizualizací nárůstu amplifikovaného produktu PCR je použití fluorescenčního barviva, tzv. interkalačního barviva (ethidium bromid, SYBR green), které má schopnost reverzibilního navázání na dvouvláknovou DNA (dsDNA). Pro značení primerů a hybridizačních sond se používají specifické molekuly flurofolů, které při přechodu z excitovaného do základního stavu světélkují. Systém značení hybridizačních sond je založený na principu FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), který využívá dvojice fluorescenčně značených sond s rezonančním přenosem energie [51].

Výsledný produkt rtPCR je kvantifikován fluorescenčními sondami, jejichž fluorescenční signál se vytváří ve stejném poměru jako amplifikované DNA v každém cyklu. Fluorescenční signál zachycují detektory, kterými jsou termocyklery pro rtPCR vybaveny.

Metoda je velmi přesná a citlivá, a právě proto je schopná zaznamenat bodové mutace, delece nebo chromozomové aberace. Detailnější zobrazení se dále využívá při studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů [50].

## 5 Závěr

Gen MLL umístěný na chromozomu 11q23 si v posledních letech získal velkou pozornost v souvislosti s maligním onemocněním. U hematologických malignit je pozorována řada chromozomálních aberací, zahrnující chromozomální translokace, částečné tandemové duplikace, delece a amplifikace genu MLL. Nejčastější abnormality genu MLL se vyskytují u více než 70 % akutní myeloidní leukémie a mezi 35 až 50 % akutní lymfoblastické leukémie u dětí kojeneckého věku. Přeuspořádání genu MLL společně s fúzními partnerskými geny, jsou v souvislosti s leukémií rozpoznávány v případech u dospělých. V procentuálním zastoupení se jedná o 10 % všech případů leukémií u dospělých pacientů.

V procesu proliferace a diferenciaci hematopoetických buněk může docházet k řadě změn. Tyto změny spolu s mutacemi genu mohou vést ke vzniku maligních hematologických onemocnění. Akutní leukémie se vyznačuje rychlým nárůstem nezralých buněk a jejich diferenciaci je zastavena na úrovni blastů. Prognóza tohoto onemocnění není příznivá.

Vypracováním této bakalářské práce jsem se snažila poskytnout přehled s racionálním vysvětlením fúzních partnerů genu MLL. Od prvního zaznamenání fúzního partnerského genu MLL bylo doposud identifikováno přes 80 fúzních partnerských genů MLL, nicméně většinu detekovaných fúzí u leukémií tvoří šest partnerských genů. K nejčastějším fúzím genu MLL patří MLL-AF4, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10, MLL-ENL a MLL-ELL. Všechny fúzní geny však přispívají k získání nových poznatků u mechanismu rozvoje onemocnění či strukturách fúzních genů, jsou rozhodující při diagnostice a léčbě leukémie. K identifikování genů se používají molekulárně cytogenetické metody, které jsou schopné odhalit přesná místa zlomu a určit konkrétní fúzní geny. V dnešní době patří detekce chromozomálních aberací k velmi důležitým diagnostickým faktorům, které přispívají k rozvíjejícím se léčebným metodám.

## 6 Použitá literatura

- [1] ROSYPAL, Stanislav. Úvod do molekulární biologie. Brno, 1998. ISBN 80-902562-5-2.
- [2] KOČÁREK, Eduard. Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika. 2. Praha: SCIENTIA, spol., 2008. ISBN 978-80-86960-36-4.
- [3] KMT2A lysinemethyltransferase2A [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4297/>
- [4] Tkachuk, D. C., Kohler, S., & Cleary, M. L. (1992). Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell*, 71(4), 691–700. doi:10.1016/0092-8674(92)90602-9
- [5] YOKOYAMA, Akihiko. Molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. The Japanese Society of Hematology. 2015, 352-361. DOI: 10.1007/s12185-015-1774-4.
- [6] BOER, J de, V WALF-VORDERWULBECKE a O WILLIAMS. In focus: MLL-rearranged leukemia [online]. 2013, 1224-1228 [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/leu201378.pdf?origin=ppub>.
- [7] MARSCHALEK, Rolf. Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways. *Annals of laboratory medicine*. 2015, 85-100. DOI: <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2016.36.2.85>. ISSN 2234-3806.
- [8] Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., & Hess, J. L. (2002). MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Molecular Cell*, 10(5), 1107–1117. doi:10.1016/s1097-2765(02)00741-4
- [9] Winters, A. C., & Bernt, K. M. (2017). MLL-Rearranged Leukemias—An Update on Science and Clinical Approaches. *Frontiers in Pediatrics*, 5. doi:10.3389/fped.2017.00004
- [10] Popovic, R., & Zeleznik-Le, N. J. (2005). MLL: How complex does it get? *Journal of Cellular Biochemistry*, 95(2), 234–242. doi:10.1002/jcb.20430
- [11] MARSCHALEK, Rolf. MLL Leukemia and Future Treatment Strategies\*. *Archiv der Pharmazie*. 2015, (348), 221-228. DOI: 10.1002/ardp.201400449.
- [12] PETERSON, Jess F. a kol. KMT2A (MLL) rearrangements observed in pediatric/young adult T-lymphoblastic leukemia/lymphoma: A 10-year review from a single cytogenetic laboratory. Wiley. 2018, , 541-546. DOI: 10.1002/gcc.22666.

- [13] Caslini, C., Yang, Z., El-Osta, M., Milne, T. A., Slany, R. K., & Hess, J. L. (2007). Interaction of MLL Amino Terminal Sequences with Menin Is Required for Transformation. *Cancer Research*, 67(15), 7275–7283. doi:10.1158/0008-5472.can-06-2369
- [14] SLANY, Robert K. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* [online]. 2009, 94(7), 984-993 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.3324/haematol.2008.002436. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704309/>
- [15] Southall, S. M., Wong, P.-S., Odho, Z., Roe, S. M., & Wilson, J. R. (2009). Structural Basis for the Requirement of Additional Factors for MLL1 SET Domain Activity and Recognition of Epigenetic Marks. *Molecular Cell*, 33(2), 181–191. doi:10.1016/j.molcel.2008.12.029
- [16] Valerio, D. G., Xu, H., Chen, C.-W., Hoshii, T., Eisold, M. E., Delaney, C., ... Armstrong, S. A. (2017). Histone Acetyltransferase Activity of MOF Is Required for MLL-AF9 Leukemogenesis. *Cancer Research*, 77(7), 1753–1762. doi:10.1158/0008-5472.can-16-2374
- [17] BRAEKELEER, Marc De. The MLL Gene and Translocations Involving Chromosomal Band 11q23 in Acute Leukemia. *Anticancer Research* [online]. 2005, (25), 1931-1944 [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: <http://ar.iiarjournals.org/content/25/3B/1931.short>.
- [18] MIHALOVÁ, Romana a Berta OTOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2615-4.
- [19] Marschalek, R. (2020). The reciprocal world of MLL fusions: A personal view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1863(7), 194547. doi:10.1016/j.bbagrm.2020.194547
- [20] MEYER C, T BURMEISTER, D GRÖGER a kol.. Leukemia: Acute myeloid leukemia [online]. 2018, (32), 273-284 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1038/leu.2017.213. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/leu2017213>.
- [21] HURET, Jean-Loup. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: t(6;11)(q27;q23) KMT2A/AFDN [online]. 2017 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0611ID1015.html>.
- [22] Manara, E., Baron, E., Tregnago, C., Aveic, S., Bisio, V., Bresolin, S., ... Pigazzi, M. (2014). MLL-AF6 fusion oncogene sequesters AF6 into the nucleus to trigger RAS activation in myeloid leukemia. *Blood*, 124(2), 263–272. doi:10.1182/blood-2013-09-525741.

- [23] Chaplin, T., Jones, L., Debernardi, S., Hill, A. S., Lillington, D. M., & Young, B. D. (2001). Molecular analysis of the genomic inversion and insertion of AF10 into MLL suggests a single-step event. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 30(2), 175–180. doi:10.1002/1098-2264(2000)9999:9999<::aid-gcc1073>3.0.co;2-n.
- [24] Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: t(11;19)(q23;p13.3) KMT2A/MLLT1 [online]. 1997 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1119ENLID1071.html>.
- [25] GUÉMICHAËL, Jian-Sheng SUN a Thomas BOUDIER. Simultaneous localization of MLL, AF4 and ENL genes in interphase nuclei by 3D-FISH: MLL translocation revisited. *BMC Cancer* [online]. 2006 [cit. 2019-05-12]. DOI: DOI: 10.1186/1471-2407-6-20. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/7339430\\_Simultaneous\\_localization\\_of\\_MLL\\_AF\\_4\\_and\\_ENL\\_genes\\_in\\_interphase\\_nuclei\\_by\\_3D-FISH\\_MLL\\_translocation\\_revisited](https://www.researchgate.net/publication/7339430_Simultaneous_localization_of_MLL_AF_4_and_ENL_genes_in_interphase_nuclei_by_3D-FISH_MLL_translocation_revisited).
- [26] Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: t(11;19)(q23;p13.1) KMT2A/ELL [online]. 1997 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1119ELLID1029.html>.
- [27] PANAGOPOULOS, Ioannis a kol. Rare MLL-ELL fusion transcripts in childhood acute myeloid leukemia—association with young age and myeloid sarcomas? [online]. 2016 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.1186/s40164-016-0037-2. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4779576/>.
- [28] ŠÁLEK, Cyril. Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2012, 14(10), 366\_372 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2012/10/05.pdf>.
- [29] INABA, Hiroto, Mel GREAVES a Charles G. MULLIGHAN. Acute lymphoblastic leukaemia [online]. 2013 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)62187-4. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3816716/>.
- [30] MAČÁK, J. J. MAČÁKOVÁ a J. DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.
- [31] THOMPSON, J. S., THOMPSON, M. W., NUSSBAUM, R. L., WILLARD H. F., MCINNES, R. R.: *Klinická genetika: Thompson & Thompson*. 6. vyd., Praha: Triton, 2004. ISBN 8072544756.

- [32] STARÝ, Jan. Akutní leukemie u dětí. *Onkologie* [online]. 2010, 4(2), 120-124 [cit. 2019-05-16]. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/02/14.pdf>.
- [33] ADAM, Z., Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2. vyd. Praha: GradaPublishing, 2008. 404 s. 2. doplněné a zcela přepracované vydání. ISBN 978-80-247-2502-4.
- [34] DOUBEK, Michael a Jiří VORLÍČEK. *Leukemie*. 2006. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/leukemie-c91-c95-1/leukemie-1/>.
- [35] The Revised French-American-British Classification of Acute Myeloid Leukemia: Is New Better?. *Annals of Internal Medicine*. 1985, 614-616 [cit. 2019-05-17]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.898.8880&rep=rep1&type=pdf>.
- [36] Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., ... Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
- [37] JANEČKOVÁ V., et al. Molekulárně genetické vyšetření u akutní myeloidní leukemie. *Klin Onkol* [online]. 2012, 411-418 [cit. 2019-05-17]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14735/amko2016411>. Dostupné z: [https://www.linkos.cz/files/klinickaonkologie/419/5094.pdf?fbclid=IwAR2e1Ncs\\_8paS1fU0t\\_d8F1j\\_tXVza51cwRxbNnyHczRYuxJhEShYMRnAGY](https://www.linkos.cz/files/klinickaonkologie/419/5094.pdf?fbclid=IwAR2e1Ncs_8paS1fU0t_d8F1j_tXVza51cwRxbNnyHczRYuxJhEShYMRnAGY).
- [38] Mrózek, K., Harper, D. P., & Aplan, P. D. (2009). Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(5), 991–1010. doi:10.1016/j.hoc.2009.07.001.
- [39] Kumar, C. C. (2011). Genetic Abnormalities and Challenges in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Genes & Cancer*, 2(2), 95–107. doi:10.1177/1947601911408076.
- [40] Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 381(9881), 1943–1955. doi:10.1016/s0140-6736(12)62187-4.
- [41] F. Huntington WILLARD, Roderick R. MCINNES a Robert L. NUSSBAUM. *Klinická genetika: Thompson & Thompson*. 6. vydání. Praha: Triton, 2004, 425 str. ISBN 80-7254-475-6.

- [42] O'CONNOR, Clara. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) [online]. 2008 [cit. 2019-03-25]. Natureeducation. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-%20fish-327>.
- [43] CARTER, Matt a Jennifer SHIEH. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. Jou [online]. 2015, 219-237 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128005118000101>
- [44] KHANNA, Chand a Melissa C. PAOLONI. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology: Molecular Diagnostics [online]. (Fourth Edition). 2007 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780721605586500113>
- [45] O'CONNOR, Clare. Karyotyping for Chromosomal Abnormalities [online]. 2008 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/karyotyping-for-chromosomal-abnormalities-298>.
- [46] Shemilt, Laura et al. "Karyotyping human chromosomes by optical and X-ray ptychography methods" *Biophysical Journal* vol. 108,3 (2015): 706-13. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4317545/>.
- [47] TRASK, Barbara J. HUMAN CYTOGENETICS: 46 CHROMOSOMES, 46 YEARS AND COUNTING [online]. 2002, 769 - 778 [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: [https://www.nature.com/scitable/content/16109/10.1038\\_nrg905.pdf#toolbar=0](https://www.nature.com/scitable/content/16109/10.1038_nrg905.pdf#toolbar=0).
- [48] OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. Základy biologie a genetiky člověka. Praha: KAROLINUM, 2012.
- [49] CLARK, David P. a Nanette J. PAZDERNIK. Molecular Biology (Second Edition): Academic Cell Update Edition [online]. 2013, , e55-e61 [cit. 2019-04-23]. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378594-7.00030-5>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123785947000305>.
- [50] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 74s. 1. vydání. ISBN 80-210-3841-1.
- [51] Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2005). Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry*, 219–259. doi:10.1016/s0065-2423(05)40006-2

## ZDROJE OBRÁZKŮ

- [51] SLANY, Robert K. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* [online]. 2009, 94(7), 984-993 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.3324/haematol.2008.002436. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704309/>.
- [52] BRAEKELEER, Marc De, Frédéric MOREL, Marie-Josée Le BRIS, Angèle HERRY a Nathalie DOUET-GUILBERT. The MLL Gene and Translocations Involving Chromosomal Band 11q23 in Acute Leukemia. *ANTICANCER RESEARCH* 25 [online]. 2005, , 1931-1944 [cit. 2020-05-10]. DOI: NATHALIE DOUET-GUILBERT1,2. Dostupné z: <http://ar.iiarjournals.org/content/25/3B/1931.full.pdf>
- [53] MEYER C, T BURMEISTER, D GRÖGER a kol. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia: Acute myeloid leukemia* [online]. 2018, (32), 273-284 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1038/leu.2017.213. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/leu2017213>
- [54] PETERSON, Jess F. a kol. KMT2A (MLL) rearrangements observed in pediatric/young adult T-lymphoblastic leukemia/lymphoma: A 10-year review from a single cytogenetic laboratory. *Wiley*. 2018, , 541-546. DOI: 10.1002/gcc.22666.