

Cytogenetika a molekulární cytogenetika v diagnostice a stanovení prognózy myeloproliferativních neoplázií

Marie Jarošová, Milena Holzerová, Radka Nedomová, Pavla Mičková, Antonín Hluší, Karel Indrák

Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc, Česká republika

Myeloproliferativní neoplázie (MPN) představují skupinu klonálních onemocnění hematopoetické kmenové buňky s fenotypickými změnami, které jsou důsledkem zvýšené myeloidní proliferace se zachovanou maturací a akumulací myeloidních buněk v periferní krvi: leukocytózou, trombocytózou a zvýšeným počtem červených krvinek nebo různou kombinací proliferace jednotlivých buněčných linií. Cytogenetické analýzy odhalily opakující se chromozomové změny u 5–45 % nemocných, ale specifická chromozomová změna zatím nebyla nalezena. K častým chromozomovým změnám, které u MPN nacházíme, patří především ztráty genetického materiálu v podobě delecí dlouhých ramen chromozomu 20 (20q-), dlouhých ramen chromozomu 13 (13q-) a delece krátkých ramen chromozomu 12 (12p-). Zmnožení genetického materiálu se týká především trisomií chromozomů 8 (+8) a 9 (+9) a parciálních duplikací dlouhých ramen chromozomu 1 (1q+). K dalším pozorovaným změnám patří balancované translokace, například chromozomu 8 s různými chromozomovými partnery. Takový nález je označován jako syndrom 8p11 (EMS – eight myeloproliferative syndrome) a vždy zahrnuje gen *FGFR1*. Cytogenetika doplněná molekulárně cytogenetickými a genetickými metodami doplňuje diagnostiku MPN, ale má význam i pro stanovení prognózy. Určení přestavby *FIP1L1/PDGFR* u nemocných s MPN s eosinofilií umožňuje zahájit efektivní cílenou léčbu imatinibem. Přesné určení genetických změn umožňuje porozumět molekulární etiopatogenezi MPN a přispívá ke zpřesnění klasifikace, prognózy a personalizace léčby nemocných.

Key words: myeloproliferativní neoplázie, chromozomové změny, cytogenetika, FISH, trisomie 8.

Cytogenetics and molecular cytogenetics in diagnosis and prognosis of myeloproliferative neoplasms

Myeloproliferative neoplasias (MPNs) are a group of hematopoietic stem cell clonal diseases with phenotypic changes resulting from increased myeloid proliferation with preserved maturation and accumulation of myeloid cells in peripheral blood: leukocytosis, thrombocytosis and increased red blood cell count or their various combinations. Cytogenetic analyses revealed recurrent chromosomal aberrations in 5–45 % of patients, but so far, a specific chromosomal change has not been found. Frequent chromosomal aberrations observed in MPNs mainly include losses of genetic material such as deletions of the long arms of chromosome 20 (20q-), long arms of chromosome 13 (13q-) and deletions of the short arms of chromosome 12 (12p-). Gains of genetic material are particularly in the form of trisomies of chromosomes 8 (+8) and 9 (+9) and partial duplications of the long arms of chromosome 1 (1q+). Other observed changes are balanced translocations, such as those of chromosome 8 with various chromosomal partners. These findings are referred to as the 8p11 myeloproliferative syndrome (EMS), always involving the *FGFR1* gene. Cytogenetic analyses supplemented with molecular cytogenetic and genetic methods play supplementary role in the diagnosis of MPNs but are also contributory prognostic determinants. Recognition of the *FIP1L1/PDGFR* rearrangement in patients with NPM with eosinophilia enables initiation of targeted therapy with imatinib, significantly improving their prognosis. Accurate determination of genetic aberrations enables understanding of the molecular etiopathogenesis of MPNs and contributes to more accurate classification and more individual therapy of patients.

Key words: myeloproliferative neoplasias, chromosome changes, cytogenetics, FISH, trisomy.

Onkologie 2012; 6(3): 152–158

Úvod

Myeloproliferativní neoplázie (MPN) jsou klonální onemocnění hematopoetické kmenové nebo progenitorové buňky tvořené řadou odlišných podskupin, které jsou charakterizovány rozdílnými klinickými projevy, změnami v počtech myeloidních buněk v periferní krvi, změnami jejich morfologie, ale i genetickými změnami. Jednotlivé podskupiny jsou charakterizovány nárůstem proliferace jedné, dvou nebo všech tří myeloidních buněčných linií v kostní dřeni s jejich příslušným nárůstem v periferní krvi.

Myeloproliferativní neoplázie (MPN) tvoří podle WHO klasifikace jednu z pěti kategorií

myeloidních malignit. Za subkategorii je považována skupina „Ph negativních (Ph-) MPN“, kterou tvoří pravá polycytemie (PV), esenciální trombocytémie (ET) a primární myelofibróza (PMF). Cytogeneticky zajímavé jsou – vzácná chronická eosinofilní leukémie (CEL), hypereosinofilní syndrom (HES) a samostatná podjednotka chronické granulocytární leukémie (CGL) (1, 2).

Společným jmenovatelem MPN je, že se jedná o klonální myeloproliferativní onemocnění, jehož příčinná mutace dosud není známá (2, 3). Nedávné určení vysoké incidence *JAK2* mutací především u nemocných s PV, PMF a ET (4–6), detekce fúze *FIP1P1/PDGFR* u MPN s eosinofilií

(7, 8) a použití cílené terapie imatinibem u těchto nemocných přineslo nový impuls pro zvýšení zájmu o genetickou diagnostiku a sledování minimální reziduální nemoci u těchto MPN.

Základní charakteristikou odlišující chronickou myeloidní leukemii (CML) od ostatních MPN je Ph negativita. Přestože neexistuje specifická chromozomová změna pro jednotlivé subtypy MPN, nalezené chromozomové změny přispívají k jejich diferenciální diagnostice a určení prognózy.

Chromozomové aberace bývají pozorovány u 5–45 % nemocných (9). Tato pozorování jsou založena především na klasickém cytogenetickém vyšetření a na metodě fluorescenční in situ

hybridizace (FISH), které jsou v současnosti doplňovány vysoce sofistikovanou analýzou celého genomu metodou array komparativní genomové hybridizace (arrayCGH) s oligonukleotidovými nebo SNP (single-nucleotide polymorphism) čipy. Cílem je určit specifické genetické změny podílející se na patogenezi MPN.

V tomto článku poskytneme přehled současných poznatků vycházejících z cytogenetických nálezů a poukážeme na jejich klinický význam u nemocných s některými typy MPN.

Metody

Konvenční cytogenetika

Klasické cytogenetické vyšetření kostní dřeně patří u nemocných s MPN k základním vyšetřením. Výsledkem cytogenetického vyšetření je sestavení nejméně 10 karyotypů a hodnocení nejméně 20 metafází podle ISCN 2009 (10).

Molekulární cytogenetika

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Metoda FISH je aplikována na preparáty připravené ze suspenze buněk zpracované pro cytogenetické vyšetření. Pro FISH vyšetření je možné aplikovat komerčně připravené lokus specifické, centromerické nebo celochromozomové sondy. V případě nálezu komplexních změn a komplexních translokací je možné použít při dostatečném počtu metafází metodu mnohobarevné FISH (mFISH) (obrázek 1) nebo pro mapování změn jednotlivých chromozomů metodu mnohobarevného pruhování (mBAND FISH) a speciální BAC (Bacterial artificial chromosome) sondy pro detailní mapování zlomových míst. V případě nepřítomnosti metafázových chromozomů je možné metodou FISH hodnotit pouze interfázové buňky, a pak je tato metoda označena jako interfázová FISH (iFISH). Hodnotí se v průměru 200–300 interfázových jader.

Čipové technologie

Rychlý rozvoj čipových technologií vedl v některých laboratořích k zařazení metody arrayCGH do rutinní praxe. Původní BAC čipy s rozlišením kolem 1 Mb (megabáze) byly v posledních letech nahrazeny čipy s vyšším, oligonukleotidovým rozlišením (11). Imobilizované sondy jsou uměle syntetizované oligonukleotidy o délce 25–70 pb (párů bází). Rozlišení takových čipů je závislé na počtu genů a jejich pokrytí sondami. V poslední době jsou stále častěji využívány znalosti o jednonukleotidových polymorfismech (SNP). SNP čipy nebo kombinace oligonukleotidových čipů se SNP sondami dovoluje nejen určit kvantitativní změny ve studovaném

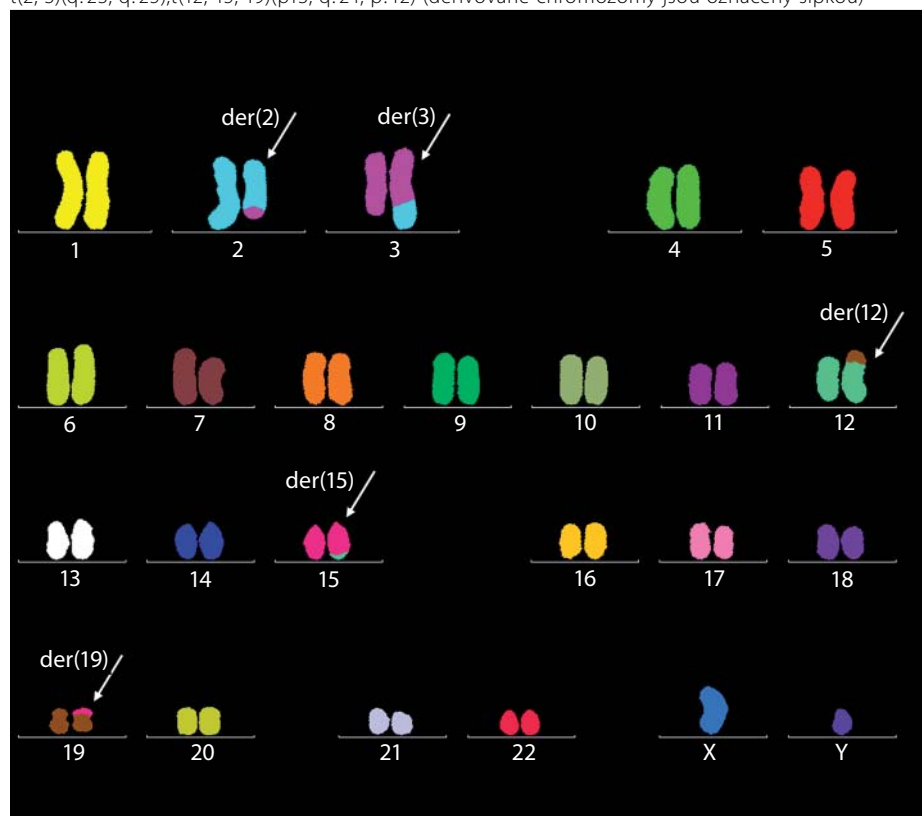
genomu, ale také výskyt uniparentální disomie (UPD) a ztráty heterozygosity (LOH) (12).

Cytogenetika pravé polycytemie (PV)

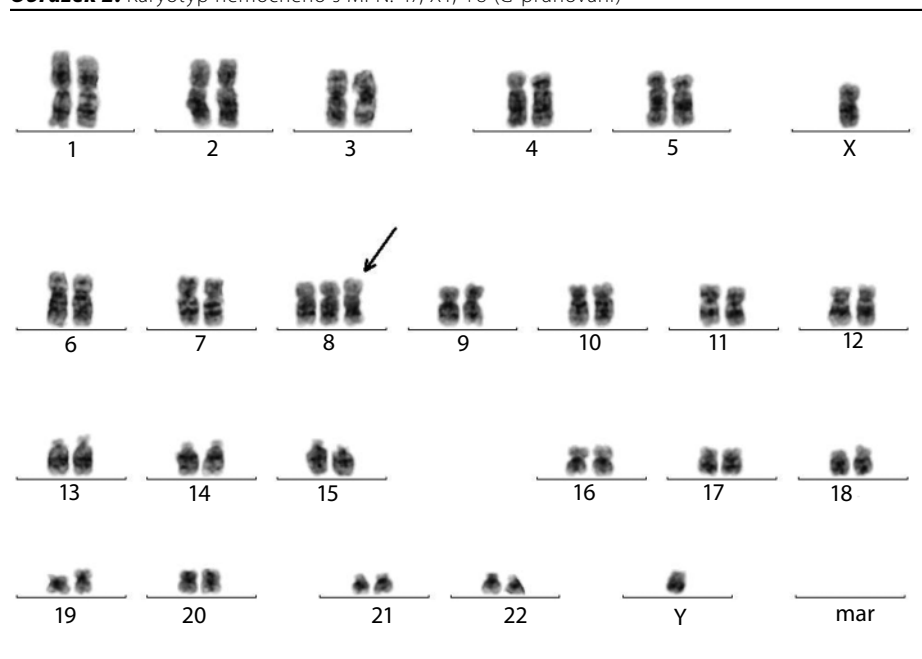
Více než 95 % nemocných s PV má mutace Janus kinase2 (*JAK2*), genu lokalizovaném na chromozomu 9p24. Nejsou to jediné mutace vyskytující se u MPN, ale např. mutace *MPL* genu, *TET2*, nebo *IDH* mají nízkou frekvenci a jejich klinický

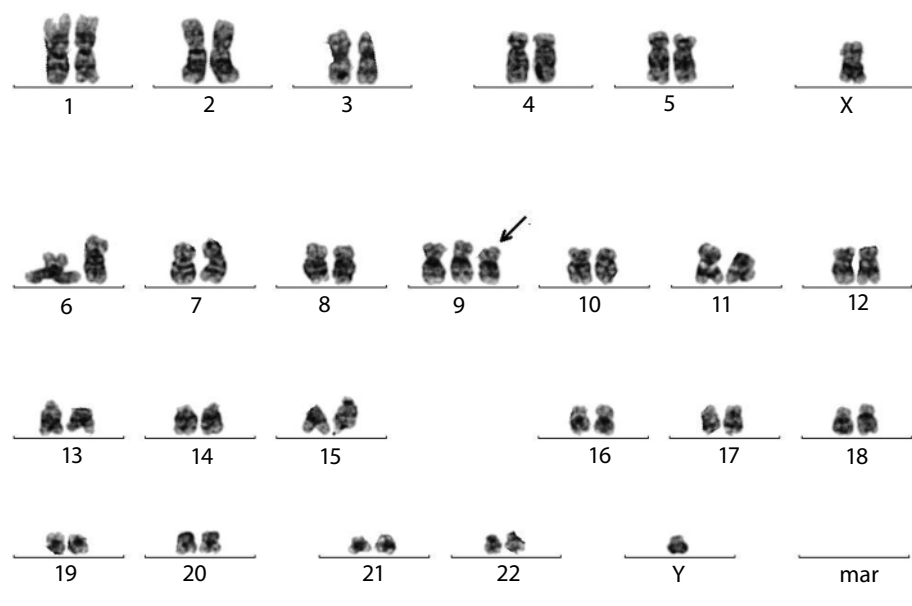
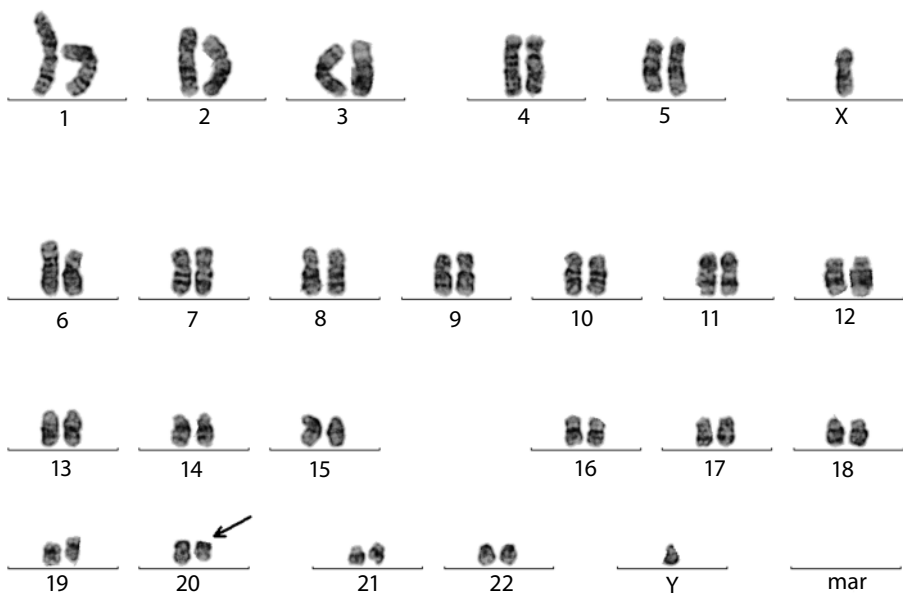
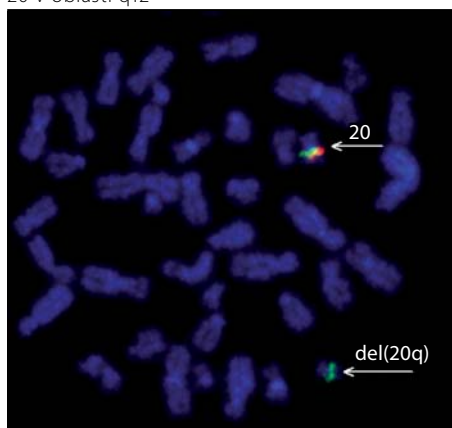
význam je zatím nejasný (3). Cytogenetické změny u PV nacházíme v průměru u 35 % nemocných (9). Řada studií ukázala, že identifikace chromozomové změny u PV v době diagnózy je spojena s nepříznivou prognózou. U části nemocných se změny objevují až v průběhu onemocnění (13–15). Terminální fází PV může být transformace do postpolycytemické myelofibrózy nebo sekundární akutní myeloidní leukemie (AML). Téměř

Obrázek 1. mFISH karyotyp nemocného s MPN s balancovanými translokacemi v karyotypu: 46, XY, t(2; 3)(q?23; q?25), t(12; 15; 19)(p13; q?24; p?12) (derivované chromozomy jsou označeny šipkou)



Obrázek 2. Karyotyp nemocného s MPN: 47, XY, +8 (G-pruhování)



Obrázek 3. Karyotyp nemocného s MPN: 47, XY, +9 (G-pruhování)**Obrázek 4a.** Karyotyp nemocného s MPN: 46, XY, del(20q)**Obrázek 4b.** Výsledek hybridizace se sondou ON MDS 20q- (PTPR 20q12)/20q11 (Kreatech, Amsterdam, The Netherlands) potvrzující delecii (chybějící červený signál) na dlouhých ramenech chromozomu 20 v oblasti q12

všichni nemocní, kteří progredují v PMF nebo AML mají chromozomové změny. Nejčastější prokázanou změnou u PV jsou trisomie chromozomu 8 a 9 (obrázky 2, 3). Trisomie chromozomu 8 a 9 mohou perzistovat i bez dalšího klonálního vývoje i více jak 15 let, zatímco přítomnost jiných chromozomových změn, jako je monosomie 7 nebo delecce 5q a komplexní karyotyp, může být signálem přechodu do terminální fáze onemocnění. Dalšími změnami, které u PV nacházíme, jsou delecce dlouhých ramen chromozomu 20 (obrázek 4), delecce chromozomu 13 a zmožení chromozomu 1q. Byly popsány i další změny: +19, +21, -Y, del (12p) a i (17q), ale jejich frekvence je nízká (9). Klasické cytogenetické vyšetření jsme provedli u souboru 54 nemocných s diagnózou

PV (16). Chromozomové změny jsme identifikovali u 35 % nemocných. Frekvence změn v době transformace PV do PMF byla 65 % a nejčastější nacházenou změnou byla delecce 20q. Neprokázali jsme zvýšený výskyt genetických změn v souvislosti s myelosupresivní léčbou. Výsledky byly v souladu s daty publikovanými v literatuře.

Zvýšení počtu identifikovaných chromozomových změn v době diagnózy bylo očekáváno se zavedením citlivější vyšetřovací metody – FISH. Jak se ukázalo, zavedení FISH u PV ale významněji nepřispělo ke zvýšení identifikace chromozomových změn a nepomohlo odhalit ani submikroskopické změny, především delecce u nemocných s normálním karyotypem (17, 18).

Cytogenetika esenciální trombocytemie (ET)

Esenciální trombocytemie (ET) je klonální maligní hematologické onemocnění, charakterizované trvalým zvýšením počtu destiček a rizikem vzniku trombotických a krvácivých komplikací. Odlišit v diferenciální diagnostice reaktivní trombocytemii od ET je často složité, ale je důležité především z léčebných a prognostických důvodů. Přes řadu provedených genetických studií nebyl nalezen jednoznačný genetický marker charakteristický pro ET. Celkem u 50 % nemocných můžeme potvrdit přítomnost *JAK2^{V617F}* mutace. Pouze malá část nemocných transformuje do sekundární myelofibrózy (post-ET MF), myelodysplastického syndromu (MDS) nebo AML (19, 20).

Jen asi u 5 % nemocných můžeme pozorovat chromozomové změny, nejčastěji trisomii chromozomu 9. Snaha určit další, dosud neodhalené změny jinou metodou, např. metodou CGH, nepřinesla žádné nové výsledky (21). Ve své práci analyzoval Gangat a spol. (22) soubor 402 nemocných s ET a chromozomové změny byly nalezeny u 7 % nemocných s nejfrekventnější změnou – trisomií chromozomu 9. Tito autoři pozorovali, že nemocní s aberacemi v době diagnózy měli splenomegalii, anémii, trombózy a jednalo se často o kuřáky. Vliv chromozomových změn na celkové přežití nebyl pozorován, stejně jako nebylo pozorováno spojení s transformací ET. Naopak Hsiao a spol. (23), kteří analyzovali vztah chromozomových změn a transformace ET u souboru 89 nemocných, prokázali vztah mezi chromozomovými změnami, leukemickou transformací a nepříznivou prognózou. V roce 2009 publikoval Sever a spol. (24) výsledky cytogenetické analýzy 172 nemocných s ET a cytogenetické změny byly pozorovány u 5,2 % nemocných v době diagnózy a u 1,7 % nemocných v průběhu transformace. Nejčastější změnou byla trisomie chromozomu 9. Autoři

nepotvrdili význam cytogenetického sledování pro včasné odhalení transformace ET.

Cytogenetika primární myelofibrózy (PMF)

Primární myelofibróza je definována jako klonální myeloproliferace charakterizovaná proliferací především megakaryocytů a granulocytů v kostní dřeni, abnormální expresí cytokinů, v plně rozvinuté fázi i fibrózou kostní dřene, anémií, splenomegalií a extramedulární krvetvorbou a ve srovnání s ostatními MPN i krátkou dobou přežívání (25). Kromě morfologického zhodnocení kostní dřene, zjištění přítomnosti fibrózy dřene a *JAK2/MPL* mutací je v době diagnózy doporučeno provést i cytogenetické vyšetření. Cytogenetické změny pozorujeme přibližně u 35 % nemocných. Nejčastěji se jedná o trisomii chromozomu 9 a delecii 13q, která však nemá specifický diagnostický význam (26).

Hussein a spol. (26) provedli metaanalýzu cytogenetických nálezů dvaceti prací u PMF. Došli k závěru, že na základě cytogenetiky nelze odlišit PMF od post PV nebo post ET myelofibrózy. Z výsledků analýzy tří největších souborů nemocných vyplynulo, že frekvence chromozomových změn v době diagnózy PMF je 33 %, 34 % a 35 % (27, 28, 29) a že nejčastějšími změnami jsou delecce del(20q) (22 %, 34 % a 36 %), del(13q) (14 %, 24 % a 25 %) a změny chromozomu 1 (19–28 %). Frekvence izolované del(20q) a del(13q) byly 14–28 % a 8 %. Detailní analýzy chromozomových zlomů na 20q určily zlomovou oblast q11.2–13.1, u delecce 13 oblast q12–22. Ani na základě této analýzy se zatím nepodařilo určit kandidátní geny z těchto oblastí, které se podílejí na patogenezi PMF. Byly však pozorovány i další změny jako -7/del(7q), del(5q), del(12p), +21 a der(6)t(1;6)(q21;p21.3), které se ale vyskytují s nízkou frekvencí. Stejně změny byly pozorovány i u post-PV MF a post-ET MF, jen jejich frekvence byla odlišná. Práce ukázala, že pozorované chromozomové změny je možné rozdělit na příznivé a nepříznivé. Jako příznivý byl označen nález normálního karyotypu nebo izolované delecce del(20q) nebo del(13q). Nepříznivý karyotyp představuje nález komplexních změn, monosomální karyotyp (MK), inv(3) a i(17q). Přítomnost MK u primární MF předurčuje horší prognózu, než je prognóza nemocných s komplexním karyotypem bez monosomie nebo se samostatnou změnou – trisomií 8 (30). Počet studovaných pacientů však byl malý a zjištěné výsledky bude nutné potvrdit na velkých souborech nemocných. Nicméně z praktického hlediska je u PMF doporučeno výsledek cytogenetiky zahrnout do prognostického hodnocení.

Chronická neutrofilní leukemie (CNL)

CNL je vzácné onemocnění s klinicky a laboratorně definovanými vlastnostmi a velmi heterogenním přežíváním nemocných. Proto i cytogenetické studie u těchto nemocných jsou vzácné a většinou se jedná o jednotlivá pozorování. Nalezené chromozomové změny se týkaly trisomií chromozomů 8, 9, delecce 20q a delecce 11q (31, 32). Většina nemocných má normální karyotyp. Předpokládá se, že nemocní mohou mít genetické změny, které mohou být submikroskopické a tedy cytogeneticky nepoznané, a že chromozomové změny jsou sekundární událostí v patogenezi CNL (33).

Myeloidní a lymfoidní neoplázie spojené s eosinofilií a změnami *PDGFRA*, *PRGFRB* a *FGFR1*

WHO klasifikace 2008 vyčlenila MPN s eosinofilií a změnami genů *PDGFR* a *FGFR1* a oddělila od samostatně stojící chronické eosinofilní leukemie (CEL) jinak nespecifikované (NOS) – (CEL, NOS) (2). Správnost tohoto přístupu byla potvrzena i pozorováním, které publikoval v roce 2009 Thiele (35). V přehledové práci o Ph- MPN a výsledcích workshopu CEL, NOS ukázal na detailní analýze 33 případů s původní diagnózou CEL, NOS význam jejího samostatného postavení. CEL, NOS byla pracovní skupinou potvrzena pouze u 4 z 33 hodnocených případů. U žádného nebyla nalezena chromozomová změna, ani přestavby genů *PDGFRA*.

Do této skupiny MPN s eosinofilií patří MPN s fúzí genů *FIP1L1/PDGFR*. Fúze je výsledkem kryptické delecce dlouhého ramene chromozomu 4 v pruhu q12. Tuto změnu popsal poprvé Cools a spol. (7) a její identifikace má význam především pro možnost úspěšně léčit tyto nemocné imatinibem. Fúzní gen je výsledkem kryptické změny, a proto je možné ji cytogeneticky určit jen metodou FISH pomocí specifické sondy FIP1L1-CHIC2-PDGFR (4q12) jak na chromozomech, tak především na interfázních jádrech (obrázek 5).

Syndrom se změnou chromozomu 8 označený jako EMS (eight myeloproliferative syndrome), někdy také jako stem cell leukemia/lymphoma (SCLL), je relativně vzácné onemocnění s typickou formou Ph negativní myeloproliferace a lymfomu, často T lymfoblastického lymfomu. Velmi často je pozorována rezistence ke konvenční chemoterapii, která vede k vývoji AML. Tento syndrom je spojen s balancovanou translokací chromozomu 8p11 (36). Zlomové místo vždy zahrnuje gen pro fibroblastový růstový receptor 1 (*FGFR1*). Ačkoliv *FGFR1* kóduje tyrozinovou kinázu, účinná léčba zatím neexistuje, a proto je jako

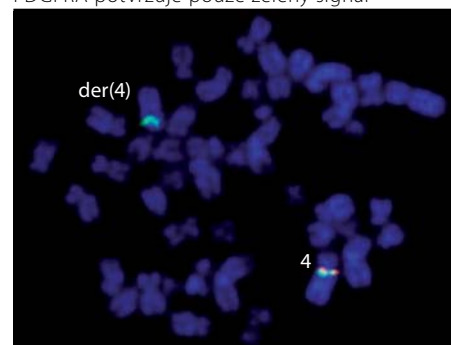
léčba volby především mladých nemocných doporučována alogenní transplantace krvetvorných buněk. Jako nejčastější translokace zahrnující gen *FGFR1* jsou uvedeny translokace t(8;13)(p11;q12) s fúzí genů *ZNF198/FGFR1*, t(8;9)(p11;q33) a t(6;8)(q27;p11–12) s fúzí *CEP110-FGFR* a *FGFR1OP1-FGFR1* (9, 37). V současnosti bylo popsáno celkem 13 fúzních partnerů a chromozomových oblastí (obrázek 6). Nemocní s přestavbou *FGFR1* mají nejčastěji MPN s eosinofilií nebo T lymfoblastický lymfom s eosinofilií (38).

Nejčastější chromozomové změny u MPN

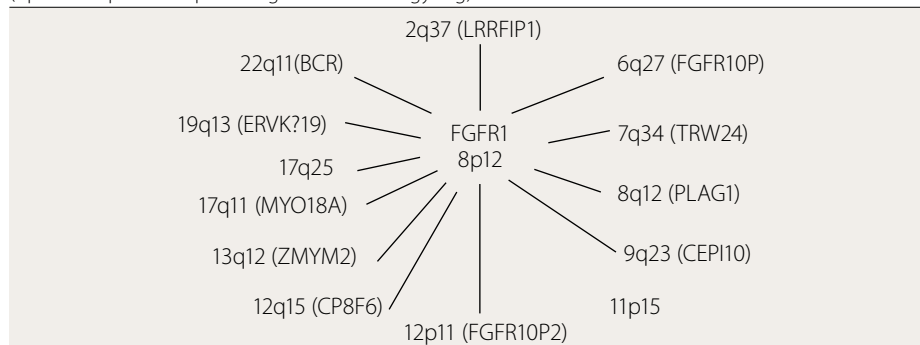
Trisomie chromozomu 8

Trisomie chromozomu 8 je nejčastější numerická chromozomová změna pozorována u myeloidních malignit. Je rutinně určována jak pomocí klasické cytogenetiky, tak metodou FISH. Zavedení metody FISH ukázalo, že i při nepřítomnosti metafází nebo jejich velmi špatné morfologii je tato metoda pomocí centromerické sondy schopná určit i malý buněčný klon s touto změnou. Ukazuje se, že frekvence změny je vyšší než prokázala klasická cytogenetika (39). Význam trisomie chromozomu 8 není zcela objasněn nejen u MPN, ale ani u jiných myeloidních malignit. Předpokládá se, že geny lokalizované na dlouhém rameni chromozomu 8 by mohly hrát významnou roli v patogenezi MPN. V této souvislosti se uvažovalo i o možné roli onkogenů lokalizovaných na 8q, především genu *CMYC*. V roce 2010 Thoennissen a spol. (40) publikovali výsledky analýzy SNP array na souboru 88 MPN nemocných a 71 MPN nemocných v blastické fázi. Touto metodou zjistili 3x více genomických změn u nemocných v blastické než v chronické fázi, a že trisomie chromozomu 8 nebo amplifikace 8q24 (*CMYC*) byla téměř výhradně pozorována u nemocných s *JAK2^{V617F}* v blastické fázi. Naopak u PV bylo pozorováno, že trisomie 8

Obrázek 5. Výsledek FISH se sondou ON FIP1L1-CHIC2-PDGFR (4q12) Del, Break (Kreatech, Amsterdam, Netherlands) u nemocného s HES. Fúzní signál (červený a zelený) představuje normální nález na chromozomu 4, delecce genu *CHIC2* a fúze *FIP1L1/PDGFR* potvrzuje pouze zelený signál



Obrázek 6. Schematické znázornění genu FGFR1, jeho fúzních partnerů a chromozomových oblastí (upraveno podle <http://atlasgeneticsoncology.org>)



může perzistovat bez dalšího klonální vývoje či transformace do AL a může být spojena s relativně dobrou prognózou (13, 14).

V posledních letech se uvažuje i o možné roli miRNA lokalizovaných na chromozomu 8. Jedná se především o miR-124a a miR-30d, které jsou lokalizovány v pruhu 8p21 a 8q23. Bylo zjištěno, že u nemocných s trisomií 8 jsou obě miRNA nadměrně exprimované, a to vedlo k úvaze o možném efektu dávky genů (41). Tato pozorování bude potřeba potvrdit na analýzách velkých souborů nemocných.

Změny chromozomu 9

Trisomie chromozomu 9 je také častou změnou u myeloidních malignit a přesnější data o této změně přinesla až technika FISH (42, 43), protože klasickou cytogenetikou nebyla tato změna většinou prokázána. Kromě klasické trisomie 9 je možné pozorovat i parciální trisomii, která se týká krátkých ramen chromozomu 9 (9p) a je výsledkem nebalancovaných translokací např. s chromozomem 1p nebo 1q, a to především u PV (44, 45). Jako rekurentní aberace u MPN byla také popsána translokace mezi chromozomy 9 a 18 se zmožením 9p (46, 47).

Doplnění cytogenetiky a FISH metodou CGH zvýšilo frekvenci detekce zmožení 9p a určilo ztrátu heterozygosity (44). Chen a spol. (48) popsali pacienty s izochromozomem krátkých ramen – i (9p) a považují tuto změnu za významnou v patogenezi PV. Za kritickou oblast je považována oblast mezi pruhy p13 až pter, kde leží řada kandidátních genů jako *JAK2*, *MLL3* nebo *SMARCA2*. Snaha určit přesněji oblast 9p a geny v ní lokalizované a jejich podíl na patogenezi MPN vedl k řadě detailních studií této oblasti. Kralovics a spol. (49) provedli mikrosatelitní analýzu oblasti 9p. Zjistili ztrátu heterozygosity 9p (9pLOH) u 33 % nemocných s PV a prokázali, že je výsledkem mitotické rekombinace a uniparentální disomie. Význam této oblasti v patogenezi PV byl nakonec potvrzen i nálezem mutace *JAK2* genu.

Delece 20q

Delece 20q je častá chromozomová změna u myeloidních, ale vzácná u lymfoidních onemocnění. Je nejčastější změnou pozorovanou nejen u nemocných s PV a PMF (asi 10%), ale i u ET a CNL. Může se vyskytovat jako samostatná změna nebo společně s dalšími změnami (50). Nález delece nejen v buňkách myeloidní, ale i lymfoidní linie (51) vedl ve svém důsledku k úvaze o možném původu MPN z časných progenitorových buněk s myeloidním i lymfoidním potenciálem (52).

Mapování deletované oblasti ukázalo, že delece je spíše intersticiální než terminální a jako nejčastěji deletovaná oblast byla určena oblast mezi pruhy q11–q13. Detailní analýza zde odhalila šest kandidátních genů a mezi nimi gen *L3MBTL*. Tento gen kóduje protein, který je transkripčním represorem a je vážným kandidátním supresorovým genem, který by se mohl podílet na patogenezi MPN (53–56).

Klinická pozorování ukazují, že skupina nemocných s delecí 20q by mohla představovat samostatnou podskupinu MPN charakterizovanou megakaryocytovou a erytroidní dysplazií (50). Prognostický význam delece není zcela jasný, protože některá pozorování nepotvrdila rozdíly v přežití nemocných s a bez delece 20q (56–58). Současně se zdá, že to neplatí pro nemocné s PMF s izolovanou delecí 20q a s dalšími změnami. Např. Březinová a spol. (59) pozorovali, že nemocní s MPN s izolovanou aberací 20q žijí déle než nemocní s delecí 20q a dalšími přídatnými změnami. Skutečný prognostický význam delece by mohly přinést až analýzy velkých souborů nemocných.

Delece 13q

Delece 13q je změnou vyskytující se častěji u PMF než u PV. Je však pozorována i u post-polycytemických MF. Zajímavé je, že je častou změnou i u lymfoidních a dalších myeloidních malignit, a že se deletované oblasti částečně překrývají (60–62). Olcaydu a spol. (63) studovali delecí 13q na souboru 367 MPN nemocných. Pozorovali

vyšší frekvenci delece u PMF a post-polycytemické myelofibrózy a určili často deletovanou oblast (CDR) o velikosti 9,8 Mb, která zahrnovala i *RB1* gen. Expresní analýza těchto případů však neukázala v granulocytech nemocných s MPN významné rozdíly v expresi mRNA ve srovnání s normální kontrolou. Na základě těchto výsledků předpokládají, že kompletní ztráta ani haploinsuficience nejsou pravděpodobně patogenetické mechanismy pro vznik MPN.

Kromě této delece jsou pozorovány balancované i nebalancované translokace, z nichž některé nesou submikroskopické delece 13q (64). Studium zlomových míst a určení genů v nich lokalizovaných by mohlo přinést další důkazy o významu těchto změn u MPN.

Změny chromozomu 1q

Aberace chromozomu 1 jsou u MPN pozorovány velmi často, ale vyskytují se i u jiných myeloidních malignit. Chromozom 1 je největší lidský chromozom a obsahuje asi 8 % lidské DNA, 1 600 známých genů a 1 000 nových kódujících sekvencí a transkriptů (65). Caramazza a spol. (66) ukázali, že existuje vztah mezi aberacemi chromozomu 1 a MPN. Týká se jak duplikací, tak delecí a nebalancovaných translokací. Např. duplikace obvykle zahrnuje u PV oblast 1q12–1q32, zatímco u PMF většinou oblast 1q32–q44. Translokace t(1;6) byla pozorována u PMF, u post-PV MF nebo u post-ET MF, zatímco translokace t(1;7) většinou u nemocných s PMF. Zajímavá jsou pozorování translokace t(1;2) (p34; p21), protože zlom nastává ve stejném místě, ve kterém je lokalizován gen pro receptor trombopoetinu (*MPL*). 11 % nemocných s PMF a nižší procento nemocných s ET nesou somatickou mutaci aktivující *MPL* (*MPLW515L*). Její úloha není zatím přesně určena (67). Výsledky čipové analýzy s použitím SNP čipů publikovali Klampfl a spol. (68). Na souboru 408 nemocných zjistili lokalizaci uniparentální disomie v oblasti 1q a určili kandidátní gen *MDM4*, který je silným inhibitorem p53. Dále pozorovali, že aberace 1q je spojena se sekundární myelofibrózou a akcelerovanou fází. Zda může zisk materiálu chromozomu 1q působit jako změna vedoucí ke kumulaci dalších změn s následnou leukemickou transformací musí potvrdit až další studie.

Nebalancované změny genomu MPN určené čipovými analýzami

Nebalancované změny v nádorovém genomu (zmožení nebo ztráty genetického materiálu) mohou vést ke ztrátě tumor supresorových genů a zmožení může vést k efektu dávky ge-

nů. Čipové analýzy potvrdily, že nebalancované změny jsou u nemocných s MPN časté. Tefferi a spol. (69) provedli analýzu arrayCGH s oligonukleotidovými čipy u 71 pacientů s MPN. Změny v počtu kopií (CNC) byly pozorovány u 44 % PMF, u 35 % pacientů s PV a u 15 % pacientů s ET. Srovnání nálezů chromozomových změn u PMF určených klasickou cytogenetikou a arrayCGH ukázalo přednostní význam metody arrayCGH s nálezem změn u 48 % nemocných ve srovnání s cytogenetikou, kde byly změny nalezeny u 36 % nemocných. Kawamata a spol. (70) použili pro vyšetření 43 MPN nemocných SNP čipy a zjistili, že genomické změny jsou u ET vzácné. Celkem u 11 nemocných (3 PV, 1 ET, 7 PMF) pozorovali uniparentální disomii 9p. Uniparentální disomie 1p byla pozorována u 4 nemocných (1 PV a 3 PMF). Největší dosud publikovaná celogenomová analýza používající SNP čipy je studie celkem 408 nemocných s MPN (65). Výsledky ukázaly, že 62,5 % vyšetřených nemocných má nejméně 1 chromozomovou změnu. Z tohoto počtu se jednalo celkem o 25 rekurentních aberací (vyskytovaly se u 3 a více nemocných). Nárůst změn byl signifikantně spojen s nárůstem věku nemocných, s progresí choroby a s leukemickou transformací. Nebalancované změny chromozomů 1q a 9p se vyskytovaly především u nemocných s progresí do sekundární myelofibrózy nebo akcelerované fáze. Změny chromozomů 1q, 7q, 5q, 6p, 7p, 19q, 22q a 3q byly asociovány s transformací do AML. Zmapováním nejčastěji postižených oblastí byly určeny kandidátní geny: pro 3p gen *FOXPI*, pro 4q *TET2*, pro 7p *IKZF1*, pro 7q gen *CUX1*, pro 12p gen *ETV6* a pro 21q gen *RUNX1*. Práce ukázala, že na rozdíl od klasické cytogenetiky má změny určené touto metodou více než 50 % nemocných. Nebyla pozorována vyšší frekvence změn u nemocných s $JAK2^{V617F}$ mutací, ale vyšší výskyt těchto změn byl pozorován u starších pacientů.

Závěr

Myeloproliferativní neoplázie jsou charakterizované klonální hematopoezou, která pravděpodobně vzniká na úrovni abnormální hematopoetické kmenové nebo progenitorové buňky. Konvenční cytogenetická analýza potvrdila klonální vývoj těchto onemocnění a určila, že chromozomové aberace se mohou objevit v časných progenitorových buňkách a mohou vznikat jako sekundární událost u nemocných s preexistující klonální hematopoezou (71). Získanou somatickou mutací je mutace $JAK2^{V617F}$ u nemocných s MPN (4–6). Mutace $JAK2^{V617F}$ je přítomna u více než 95 % nemocných s PV

a u 50 % pacientů s PMF a nebo ET. Tato mutace byla pozorována u MPN v CD34+ buňkách (72), stejně jako v progenitorových MPN buňkách a v buňkách schopných repopulace dřeně, potvrzující původ tohoto onemocnění v primitivních hematopoetických progenitorových buňkách. Klinické a molekulární studie přesto ukázaly, že mutace $JAK2^{V617F}$ nemusí být jedinou událostí zodpovědnou za vznik MPN. V současnosti se uvažuje o dvou možných modelech a roli mutace $JAK2^{V617F}$ v klonálním vývoji MPN (73, 74). První model předpokládá, že $JAK2^{V617F}$ je sama zodpovědná za vývoj MPN a že tato mutace iniciuje a podněcuje klonální hematopoezu. Druhý model předpokládá, že iniciální je mutace dosud neznámého(mých) genu(ů), které předchází $JAK2^{V617F}$ mutaci. Taková pre- $JAK2$ mutace může poskytnout klonální základ pro získání řady aktivujících mutací, včetně $JAK2^{V617F}$, $JAK2$ exon 12 mutace nebo *MPL* mutace. Přítomnost obou *MPL* a $JAK2$ mutací u některých pacientů s PMF a ET podporuje druhou hypotézu (75). Pokud je tento model správný, pak by $JAK2^{V617F}$ představovala sekundární událost v průběhu vývoje MPN. Vedle této mutace nacházíme u nemocných s PMF v 50 % chromozomové aberace, ale u PV je nacházíme jen u 29 % nemocných a u nemocných s ET jen u 8–10 % (76–78). Vztah mezi chromozomovými změnami, které zahrnují trisomii 9/+9p, del(20q), trisomii 8, přestavby 13q, 1q a $JAK2^{V617F}$ mutaci zatím nebyl určen. Jedná se o změny, které nejsou pro MPN specifické a jejich role v etiopatogenezi a progresi choroby zatím není známa. Studie Wang a kol. (79) ukázala, že v hematopoetických progenitorech MPN nemusí probíhat genetické události vždy ve stejném pořadí. Změny, jako je +8 a +9, mohou někdy předcházet vzniku $JAK2^{V617F}$ mutace. Tento nález pak podporuje existenci časných genetických událostí, které předchází $JAK2^{V617F}$ mutaci nebo cytogenetickým aberacím v hematopoetických progenitorových buňkách MPN. Při hodnocení vztahu $JAK2^{V617F}$ mutace a chromozomových změn bylo pozorováno, že del(20q) se může objevit před $JAK2$ mutací (75, 80) a jen vzácně mohou mít pacienti biklonální onemocnění (75). Všechny tyto skutečnosti potvrzují komplexní vztah chromozomových změn a mutace $JAK2^{V617F}$ a ukazují, že tyto dvě události mohou být na sobě nezávislé.

Další cytogenetické, molekulární cytogenetické a celogenomové analýzy v blízké budoucnosti jistě přinesou další informace k pochopení patogeneze MPN.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem MSM 6198959205 a grantem LF 2012–007.

Literatura

1. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; 110: 1092–1097.
2. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–951.
3. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: $JAK2$, *MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH* and *IKZF1*. *Leukemia* 2010; 24: 1128–1138.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain of function mutation in $JAK2$ is frequently found in patients with myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779–1790.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosin kinase $JAK2$ in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054–1061.
6. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal $JAK2$ mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature* 2005; 28: 1144–1148.
7. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by the fusion of the *PDGFRA* and *FIP1L1* genes as a therapeutic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1201–1214.
8. Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: clinical implications. *Cancer Lett* 2007; 255(1): 12–25.
9. Haeflrich T, Bacher U, Kern W, et al. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Ann Hematol* 2008; 87: 1–10.
10. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Vyd. Karger; 2009.
11. Kresse SH, Szuhai K, Barragan-Polania AH, et al. Evaluation of high-resolution microarray platforms for genomic profiling of bone tumours. *BMC* 2010; 3: 223–229.
12. Ylstra B, van den IJssel PJ, Carvalho B, et al. BAC to the future or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 2006; 34(2): 445–450.
13. Panani AD. Single chromosome abnormalities in Philadelphia negative – chronic myeloproliferative disorders. *In vivo* 2007; 21: 867–870.
14. Diez Martin JL, Graham DL, Pettitt RM, DeWald GW. Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera. *Mayo Clin Proc* 1991; 68: 287–299.
15. Swolin B, Weinfeld A, Westin J. A prospective long-term cytogenetic study in polycythemia vera in relation to treatment and clinical course. *Blood* 1988; 72: 386–395.
16. Jarošová M, Indrák K, Dušek J, Kapustová M. Cytogenetic studies in polycythemia vera. *Neoplasma* 1988; 35: 221–228.
17. Gribble SM, Reid AG, Bench AJ, et al. Molecular cytogenetics of polycythemia vera: lack of occult rearrangements detectable by 20q LSP screening, CGH, and M-FISH. *Leukemia* 2003; 17: 1419–1421.
18. Zamora L, Espinet B, Florensa L, et al. Is fluorescence in situ hybridization useful method in diagnosis of polycythemia vera patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 151: 139–145.
19. Tefferi A, Gangat N, Wolanskyj AP, et al. 20 yr without leukemic or fibrotic transformation in essential thrombocythemia or polycythemia vera: predictors at diagnosis. *Eur J Haematol* 2008; 80: 386–390.
20. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 159–166.
21. Larramendy ML, Knuutila S, Jantunen R, et al. No DNA sequence copy number changes in essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 129: 181–182.

22. Gangat N, Tefferi A, Thanarajasingam G, et al. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur J Haematol* 2009; 83: 17–21.
23. Hsiao H, Ito Y, Sashida G, et al. De novo appearance of der (1; 7) (q10;p10) is associated with leukemic transformation and unfavorable prognosis in essential thrombocythemia. *Leuk Res* 2005; 29(11): 1247–1252.
24. Sever M, Kantarjian H, Pierce S, et al. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia at presentation and transformation. *In J Hematol* 2009; 90: 522–525.
25. Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2009; 6: 627–637.
26. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *Eur J Haematol* 2009; 82(5): 329–338.
27. Hussein K, Huang J, Lasho T, et al. Karyotype complements the International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis. *Eur J Haematol* 2009; 82: 255–259.
28. Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, et al. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol* 1997; 98: 96–102.
29. Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 1996; 88: 1013–1018.
30. Rakhee V, Caramazza D, Begna KH, et al. Monosomal karyotype in primary myelofibrosis is detrimental to both overall and leukemia-free survival. *Blood* 2011; 117(21): 5612–5615.
31. Bohm J, Schaefer HE. Chronic neutrophilic leukaemia: 14 new cases of an uncommon myeloproliferative disease. *J Clin Pathol* 2002; 55: 862–864.
32. Bohm J, Kock S, Schaefer HE, Fisch P. Evidence of clonality in chronic neutrophilic leukaemia. *J Clin Pathol* 2003; 56: 292–295.
33. Elliott MA. Chronic neutrophilic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia: WHO defined. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 571–593.
34. Gotlib J, Cools J, Malone III JM, et al. The FIP1L1-PDGFR α fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. *Blood* 2004; 103: 2879–2891.
35. Thiele J. Philadelphia Chromosome–Negative Chronic Myeloproliferative Disease. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 261–280.
36. Goradia A, Bayerl M, Cornfield D. The 8p11 Myeloproliferative Syndrome: Review of Literature and an Illustrative Case Report. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 448–456.
37. Popovici C, Zhang B, Gregoire MJ, et al. The t (6; 8) (q27; p11) translocation in a stem cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, FOP, to fibroblast growth factor receptor 1. *Blood* 1999; 93: 1381–1389.
38. Bain BJ. Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFR α , PDGFR β or FGFR1. *Haematologica* 2010; 95: 696–698.
39. Jenkins RB, Le Beau MM, Kraker WJ, et al. Fluorescence in situ hybridization: a sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood* 1992; 79: 3307–3315.
40. Thoenissen NH, Lee UO, Lee DHT, et al. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome–negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010; 115: 2882–2890.
41. Lim LP, Lau LC, Garrett-Mengele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769–773.
42. Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Atkinson S, et al. The incidence of trisomy 8, trisomy 9 and D20S108 deletion in polycythemia vera: an analysis of blood granulocytes using interphase fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 2000; 110: 839–846.
43. Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1998; 11: 819–848.
44. Najfeld V, Montella L, Scalise A, et al. Exploring polycythemia vera with fluorescence in situ hybridization: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected. *Br J Haematol* 2002; 119: 558–566.
45. Sambani C, La Starza R, Pierini V, et al. Leukemic recombinations involving heterochromatin in myeloproliferative disorders with t (1; 9). *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 162: 45–49.
46. Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Atkinson S, Pearson TC. Polycythemia vera: analysis of DNA from blood granulocytes using comparative genomic hybridization. *Haematologica* 2001; 86: 464–469.
47. Bacher U, Haferlach T, Schoch C. Gain of 9p due to an unbalanced rearrangement der (9; 18): a recurrent clonal abnormality in chronic myeloproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 160: 179–183.
48. Chen Z, Notohamiprodjo M, Guan XY, et al. Gain of 9p in the pathogenesis of polycythemia vera. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22: 321–324.
49. Kralovics R, Guan Y, Pichal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002; 30: 229–236.
50. Kurtin PJ, Dewald GW, Shields DJ, et al. Hematologic disorders associated with deletions of chromosome 20q: a clinicopathologic study of 107 patients. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 680–688.
51. Knuutila S, Teerenhovi L, Larremendy ML, et al. Cell lineage involvement of recurrent chromosomal abnormalities in hematologic neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10: 95–102.
52. Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, et al. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003; 101: 1981–1983.
53. Nacheva E, Holloway T, Carter N, et al. Characterization of 20q deletions in patients with myeloproliferative disorders or myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 80: 87–94.
54. Wang PW, Eisenbart JD, Espinosa R, et al. Refinement of the smallest common deleted segment of chromosome 20 in malignant myeloid diseases and development of PAC-based physical and transcription map. *Gemonics* 2000; 67: 28–39.
55. Bench AJ, Nacheva E, Hood TL, et al. Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. *Oncogene* 2000; 19: 3902–3913.
56. Bench AJ, Li J, Huntly BJP, et al. Characterization of the imprinted polycomb gene L3MBTL a candidate 20q tumor suppressor gene, in patients with myeloid malignancies. *Br J Haematol* 2004; 127: 509–518.
57. Strasser-Weippl K, Steuer M, Kees M, et al. Prognostic relevance of cytogenetics determined by fluorescent in situ hybridization in patients having myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer* 2006; 107: 2801–2806.
58. Campbell LJ, Garson OM. The prognostic significance of deletion of the long arm of chromosome 20 in myeloid disorders. *Leukemia* 1994; 8: 67–71.
59. Brezinova J, Zemanova Z, Ransdorfova S, et al. Prognostic significance of del (20q) in patients with hematological malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 160: 188–192.
60. Chung CY, Kantarjian H, Haidar M, et al. Deletions in the 13q14 locus in adult lymphoblastic leukemia: rate of incidence and relevance. *Cancer* 2000; 88: 1359–1364.
61. Gardiner A, Corcoran M, Ibbotson R, et al. An analysis of chromosome 13q14 deletions in myelofibrosis using FISH and Southern-based hybridization. *Blood* 1997; 90(Suppl. 1): 4062.
62. Pastore C, Nomdedeu J, Volpe GA, et al. Genetic analysis of chromosome 13 deletions in BCR/ABL negative chronic myeloproliferative disorders. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 14: 106–111.
63. Olcaydu D, Berg T, Gisslinger B, et al. Deletions of Chromosome 13q in myeloproliferative neoplasms: Mapping, relation to the JAK2-V617F mutation and evaluation of potential tumor suppressor candidates. *Blood* 2008; Abstract Book 112: 3724.
64. Sinclair EJ, Forrest EC, Reilly JT, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of 25 cases of idiopathic myelofibrosis and two cases of secondary myelofibrosis. Monoallelic loss of RB1, D13S319 and D13S25 loci associated with cytogenetic deletion and translocation involving 13q14. *Br J Haematol* 2001; 113: 365–368.
65. Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, et al. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* 2006; 441: 315–321.
66. Caramazza D, Hussein K, Siragusa S, et al. Chromosome 1 abnormalities in myeloid malignancies: a literature survey and karyotyp-phenotyp association. *E J Haematol* 2009; 84: 191–200.
67. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is novel somatic activating mutation in myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3: 270.
68. Klampfl T, Harutyunyan A, Berg T, et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood* 2011; doi: 10.1182/blood-2011-01-331678.
69. Tefferi A, Sirhan S, Sun Y, et al. Oligonucleotide array CGH studies in myeloproliferative neoplasms: comparison with JAK2V617F mutational status and conventional chromosome analysis. *Leuk Res* 2009; 33: 662–664.
70. Kawamata N, Ogawa S, Yamamoto G, et al. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. *Exp Hematol* 2008; 36: 1471–1479.
71. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, et al. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976; 295: 913–916.
72. Ishii T, Bruno E, Hoffman R, Xu M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood* 2006; 108: 3128–3134.
73. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006; 355: 2452–2466.
74. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev* 2007; 7: 673–683.
75. Kralovics R, Teo SS, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108: 1377–1380.
76. Beer PA, Jones AV, Bench AJ, et al. Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *Br J Haematol* 2009; 144: 904–908.
77. Andrieux J, Demory JL. Karyotype and molecular cytogenetic studies in polycythemia vera. *Curr Hematol* 2005; 4: 224–229.
78. Reilly JT. Cytogenetic and molecular genetic abnormalities in agnogenic myeloid metaplasia. *Semin Oncol* 2005; 32: 359–364.
79. Wang X, LeBlanca A, Gruensteina S. Clonal analyses define the relationships between chromosomal abnormalities and JAK2V617F in patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Experimental Hematology* 2009; 37: 1194–1200.
80. Schaub FX, Jager R, Looser R, et al. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2–V617F in MPD suggests that del 20q acts independently and is not one of the pre-disposing mutations for JAK2-V617F. *Blood* 2009; 113: 2022–2027.

Článek přijat redakcí: 17. 5. 2012

Článek přijat k publikaci: 6. 6. 2012

prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.
Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc
 I. P. Pavlova 6, 77520 Olomouc
 marie.jarosova@fnol.cz
