

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Hana Votavová

Odlišení primárně mediastinálního a difuzního velkobuněčného B-lymfomu
s využitím metody real-time kvantitativní polymerázové řetězové reakce

Distinguishing of primary mediastinal B-cell lymphoma and diffuse large B-cell
lymphoma with real-time quantitative polymerase chain reaction

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Ivan Špička, CSc.

Praha 2010

Prohlášení:

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

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

V Praze, 30.10.2010

HANA VOTAVOVÁ

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

VOTAVOVÁ, Hana. *Odlišení primárně mediastinálního a difuzního velkobuněčného B-lymfomu s využitím metody real-time kvantitativní polymerázové řetězové reakce. [Distinguishing of primary mediastinal B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with real-time quantitative polymerase chain reaction].* Praha, 2010. 102 s., 9 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. Lékařská fakulta, 1. Interní klinika. Školitel Trněný, Marek.

PŘÍLOHY:

1. podepsané závazné prohlášení
2. identifikační záznam
3. autoreferát
4. životopis
5. seznam publikovaných prací
6. posudek školitele
7. separáty publikací s impakt faktorem
8. doklad o vykonání jazykové zkoušky
9. výkaz o studiu s potvrzením o vykonání státní doktorské zkoušky

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli Prof. Markovi Trněnému za odborné vedení, koordinaci spolupráce mezi zúčastněnými pracovišti, za zajištění financování projektu a pomoc při zpracovávání odborných textů.

Děkuji školiteli konzultantovi Doc. Ivanu Špičkovi za odbornou pomoc v oblasti hodnocení klinických dat v oboru hematologie a za pomoc při zpracovávání odborných textů.

Děkuji všem spolupracovníkům na patologických ústavech VFN a FN Motol za zpracování patologické části projektu, statistikovi RNDr. Bohumíru Procházkovi za odbornou analýzu dat a celému laboratornímu týmu laboratoře molekulární biologie 1. interní kliniky VFN a 1. LF UK za podporu.

SEZNAM PUBLIKACÍ – PŮVODNÍ ČLÁNKY:

A) s disertací přímo související:

VOTAVOVA, H. – FORSTEROVA, K. – STRITESKY, J. – VELENSKA, Z. – TRNENY, M. Optimized protocol for gene expression analysis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Diagnostic Molecular Pathology*, Sep 2009, vol. 18, no. 3, 176–182. IF 1,770.

VOTAVOVA, H. – FORSTEROVA, K. – CAMPR, V. – STRITESKY, J. – VELENSKA, Z. – PYTLIK, R. – KUBACKOVA, K. – PROCHAZKA, B. – KODET, R. – SPICKA, I. – KREJCOVA, H. – TRNENY, M. Distinguishing of Primary Mediastinal B-cell Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Neoplasma*, Oct 2010, vol. 57, no. 5, p. 449-454. IF 1,19.

Odesláno:

VOTAVOVA, H. – FORSTEROVA, K. – CAMPR, V. – STRITESKY, J. – VELENSKA, Z. – PYTLIK, R. – PROCHAZKA, B. – TRNENY, M. CD10 expression in lymph node stromal cells does not significantly influence gene expression analysis of CD10 positivity or negativity of a tumor. *Journal of Clinical Pathology*, IF 2,342.

B) s dizertací přímo nesouvisející:

FORSTEROVA, K. – VOTAVOVA, H. – SCHWARZ, J. – KARBAN, J. – STUKA, C. – TRNENY, M. K. Advanced Rai stage in patients with chronic lymphocytic leukemia correlates with simultaneous hypermethylation of plural tumor suppressor genes. *Folia Biologica* 2010 - přijato k publikaci. IF 1,140.

SEZNAM PUBLIKACÍ – POSTERY, ABSTRAKTA:

A) s disertací přímo související:

14th EHA Congress, Berlin – poster 6/09:

Votavova H, Forsterova K, Campr V, Stritesky J, Velenska Z, Pytlik R, Kubackova K, Prochazka B, Kodet R, Trneny M. DISTINGUISHING OF PRIMARY MEDIASTINAL B-CELL LYMPHOMA AND DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA USING REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION.

15th EHA Congress, Barcelona – poster 6/10:

Votavova H, Forsterova K, Campr V, Stritesky J, Velenska Z, Pytlik R, Prochazka B, Trneny M. : LIMITED NUMBER OF GENES DISTINGUISHES BETWEEN GERMINAL CENTRE-LIKE AND NONGERMINAL CENTRE-LIKE DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA

15th EHA Congress, Barcelona – abstract 6/10:

Votavova H, Forsterova K, Campr V, Stritesky J, Velenska Z, Pytlik R, Prochazka B, Trneny M. CD10 EXPRESSION IN LYMPH NODE STROMAL CELLS DOES NOT SIGNIFICANTLY INFLUENCE GENE EXPRESSION ANALYSIS OF CD10 POSITIVITY OR NEGATIVITY OF A TUMOR.

B) s disertací přímo nesouvisející:

XV. ČESKO-SLOVENSKÝ HEMATOLOGICKÝ A TRANSFUZIOLOGICKÝ SJEZD – poster 9/08:

K. Forsterová, H. Votavová, J. Schwarz, J. Běláček, Č. Štuka, J. Karban, M. Trněný.
ABERANTNÍ METYLACE PROMOTORŮ VYBRANÝCH GENŮ U CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE – VÝSLEDKY PILOTNÍ STUDIE.

OBSAH

SOUHRN.....	11
ABSTRACT.....	12
ČLENĚNÍ TEXTU.....	13
1. ÚVOD.....	14
1.1. Molekulární genetik difuzního velkobuněčného a primárně mediastinálního B-lymfomu.....	14
1.2. Klinika difuzního velkobuněčného a primárně mediastinálního B-lymfomu.....	17
1.2.1 Difuzní velkobuněčný lymfom.....	17
1.2.2. Primárně mediastinální B-lymfom.....	18
1.2.3. Terapie DLBCL/PMBL.....	19
1.3. Diagnosticky využívané metody.....	19
1.3.1. Imunohistochemie.....	20
1.3.2. RTqPCR.....	24
1.4. Geny vyšetřované v předkládané práci.....	33
1.4.1. Geny vyšetřované pomocí RTqPCR.....	33
1.4.2. Vyšetřované imunohistochemické markery.....	33
1.4.3. Molekula <i>CD10</i>	34
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	36
2.1. Hypotéza.....	36
2.2. Cíle práce.....	36
3. MATERIÁL A METODIKA.....	37
3.1 Metody I.....	37
3.1.1. Izolace RNA z parafinových bloků.....	37
3.1.2. Reverzní transkripce.....	38
3.1.3 Kontrola kvality RNA.....	39
3.1.4. Reverzní transkripce (RT) a kvalitativní PCR.....	39
3.1.5. Gelová elektroforéza.....	41
3.1.6. RTqPCR.....	41
3.1.7. Kontrolní skupina – validační set.....	43
3.1.8. Statistika.....	43

3.2. Metody II.....	44
3.2.1. RTqPCR.....	44
3.2.2. Imunohistochemie.....	44
3.2.3. Statistika.....	44
3.3. Metody III.....	45
3.3.1. Soubor pacientů.....	45
3.3.2. Výběr vyšetřovaných genů.....	45
3.3.3. Isolace RNA a RTqPCR metoda.....	46
3.3.4. Testovací a validační set.....	46
3.3.5. Imunohistochemie.....	46
3.3.6. Statistika.....	48
4. VÝSLEDKY.....	49
4.1. Výsledky I.....	49
4.1.1. RNA izolace z FFPE tkáně.....	49
4.1.2. Spektrofotometrická analýza RNA.....	54
4.1.3. Reverzní transkripce a kvalitativní PCR.....	54
4.1.4 Porovnání detekce fluorescence pomocí SYBR green a vlastní Taqman sondy.....	56
4.1.5. Porovnání vlastní a komerční Taqman sondy při vyšetření FFPE tkáně.....	58
4.1.6. Sestavení konečného protokolu a jeho ověření.....	58
4.2. Výsledky II.....	60
4.3. Výsledky III.....	63
4.3.1. Genová exprese v testovacím setu a predikční rovnice.....	63
4.3.2. Validační set	65
4.3.3. Analýza genové exprese v celém souboru	65
4.3.4. Analýza klinických charakteristik souboru.....	66
4.3.5. Diskordantní pacienti.....	68
4.3.6. Diskordantní versus konkordantní PMBL pacienti.....	70
4.3.7. Diskordantní PMBL versus konkordantní DLBCL pacienti.....	70
4.3.8. Diskordantní DLBCL pacienti.....	70

4.3.9. Analýza přežití.....	70
4.3.10 Imunohistochemická analýza nádorových vzorků.....	72
5. DISKUSE.....	74
6. ZÁVĚRY PRÁCE	78
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	80
SEPARÁTY PŮVODNÍCH PRACÍ.....	90

SOUHRN

Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) je nejčastější typ non-Hodgkinského lymfomu. Je to molekulárně i prognosticky heterogenní onemocnění, jehož tři hlavní geneticky definované podtypy (germinal center-like/GC-like, non-germinal center-like/nonGC-like a primárně mediastinální B-lymfom/PMBL) není v současné době možné spolehlivě odlišit jinak než pomocí genových čipů. Metoda genových čipů vyžaduje dostupnost čerstvě zmražené vyšetřované tkáně a její technická a ekonomická náročnost ji činí v rutinní praxi nevyužitelnou. Vzhledem k prognostické odlišnosti je však informace o podtypu DLBCL důležitá. Jednak ze strany pacienta, který má právo vědět, jak závažné je jeho onemocnění, jednak z hlediska klinických studií, u kterých může mít náhodné zařazování pacientů bez znalosti podtypu tumoru vliv na výsledky studie.

Předkládaná práce se zabývá zjednodušením diagnostiky podtypu primárně mediastinálního B-buněčného lymfomu (PMBL) v rámci skupiny DLBCL. Využívá běžně dostupné a na skladování nenáročné vzorky tkání zalitých v parafinových blocích (tzv. FFPE tkáň) a dále analýzu genové exprese pomocí všeobecně rozšířené metody real-time kvantitativní PCR (RTqPCR). Jako výchozí metoda pro odlišení PMBL/DLBCL pacientů je v práci použita klinicko-patologická diagnóza, která je v současnosti uznávána jako relevantní klasifikační postup vzhledem k nedostupnosti genových čipů. Její shoda s genovými čipy je však pouze 76%. V předkládané práci je navržen nový způsob odlišení PMBL a DLBCL diagnóz vycházející z genové exprese tří pečlivě zvolených genů. Oba diagnostické algoritmy jsou srovnány pomocí analýzy klinických dat pacientů. Genetická klasifikace se dle získaných výsledků více přibližuje vyšetřením na genových čipech než klasifikace klinicko-patologická.

Klíčová slova:

Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL), primárně mediastinální B-lymfom, genová exprese, genové čipy/mikroarraye, real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RTqPCR), tkáň fixovaná ve formolu a zalitá v parafínu (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, FFPE).

ABSTRACT

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of non-Hodgkin lymphoma. It is a molecular and prognostic heterogeneous disease. Three main genetic subtypes are called germinal center-like DLBCL (GC-like DLBCL), non-germinal center-like DLBCL (nonGC-like DLBCL) and primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL). These subtypes can be reliably distinguished only with usage of gene expression profiling (GEP). The GEP method can be applied only when fresh frozen tissue is available. The method is technically difficult and expensive. Thus, it is not used routinely. Since the DLBCL subtypes differ in prognosis, it is extremely important to be able to distinguish them.

The presented thesis is focused on distinguishing of PMBL diagnosis in the group of DLBCL. Easily stored formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE) and gene expression analysis using real-time quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR) are used.

In the first step, PMBL and DLBCL cases were distinguished with an internationally accepted clinical-pathological method. The agreement between clinical-pathological diagnosis and GEP is only 76%. In the presented text a genetic algorithm for PMBL/DLBCL distinguishing is suggested. It uses three carefully chosen genes and their expression is measured with RTqPCR. Both, the clinical-pathologic and genetic algorithms are compared with help of clinical data. The genetic one seems to be closer to the GEP method than the clinical-pathologic one.

The text describes the establishment of the gene expression analysis from FFPE tissue using RTqPCR method. Clinical data are analyzed with respect to both the algorithm described above.

Keywords:

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL), gene expression profiling (GEP), gene microarray, real-time quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR), formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE).

ČLENĚNÍ TEXTU

Následující text je rozdělen do statí Úvod, Hypotézy a cíle práce, Materiál a Metodika, Výsledky, Diskuse, Závěry práce a Použitá literatura. Stati Materiál a Metodika a Výsledky jsou dále rozčleněny do úseků označených římskými I, II a III. Úsek I je věnován zavádění metodiky analýzy genové exprese pomocí RTqPCR s využitím FFPE tkáně. Úsek II je věnován ověření vlivu exprese nenádorových stromálních buněk na celkové výsledky. Úsek III je věnován vlastní analýze genové exprese PMBL a DLBCL a klinickému zhodnocení studovaného souboru v souvislosti se získanými výsledky.

1. ÚVOD

1.1. Molekulární genetika difuzního velkobuněčného a primárně mediastinálního B-lymfomu

Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) je důležitou diagnostickou jednotkou, která dle dat Kooperativní lymfomové skupiny (KLS) tvoří přibližně 45% z nově diagnostikovaných non-Hodgkinských lymfomů (NHL) v České republice (1). Primárně mediastinálním B-lymfomem (PMBL) jako zvláštní diagnostickou podjednotkou DLBCL je postiženo 2-5% pacientů s NHL. (1, 2, 3, 4).

Průlomová práce v oblasti molekulární biologie DLBCL byla publikována Alizadehem et al. (5) v roce 2000. Na základě simultánního vyšetření několika tisíc genů metodou genových microarray/čipů (viz níže) a analýzy tzv. genových signatur nádorových buněk byly nejprve identifikovány dvě podskupiny DLBCL, označené jako GC-like (germinal center) a ABC-like (activated B cell) DLBCL. Genová signatura je definována jako skupina genů exprimovaná v určité buněčné linii, v určitém stádiu diferenciaci nebo během určité biologické odpovědi (6). V podstatě se jedná o rozsáhlé genové skupiny odpovídající jednotlivým, buňkou právě využívaným genovým programům. Obě skupiny DLBCL se od sebe v Alizadehově práci lišily odpovědí na terapii. Celkové pětileté přežití GC-like pacientů bylo 76%, u ABC-like pacientů to bylo pouze 16%. Obě podskupiny se chovaly jako prognostické faktory nezávislé na IPI (viz dále) (5).

Vzhledem k přítomnosti přeskupených imunoglobulinových genů a jejich pokračujících somatických hypermutací se předpokládá, že k maligní transformaci DLBCL buněk dochází až poté, co buňky vstoupily do tzv. germinálního centra (GC) sekundárního lymfatického orgánu, ve kterém se B-buňky setkávají se svými antigeny a specializují se na jejich účinnou eliminaci. V uvedené práci bylo zjištěno, že genová signatura GC-like DLBCL buněk je podobná zdravým buňkám germinálních center a signatura ABC-like DLBCL buněk in vitro aktivovaným B-buňkám periferní krve. Vzhledem k expresi diferenciacních antigenů je obecně přijímána teorie, dle které k malignímu zvratu v případě GC-like buněk dochází ve fázi GC vývoje, zatímco ABC buňky maligně transformují ve fázi, kdy germinální centrum opouštějí. GC-like buňky jsou tak charakterizovány typickými markery germinálního centra, jako např. molekulami *CD10*, *CD38*, *A-myb*, *Bcl6* a *Lmo2*, pro ABC-like buňky jsou typické

znaky jako *Irf4/Mum1* nebo inhibitory apoptozy *Flip* a *Bcl2*. Uvedené podskupiny DLBCL (GC- a ABC-like) jsou histologicky i imunohistochemicky neodlišitelné (5).

V nádorové tkáni byly dále zjištěny i další genové signatury, odpovídající nenádorové buněčné příměsi, uváděné společně pod termínem „lymph-node signature“. Spadají do ní expresní programy monocytů, makrofágů a extracelulární matrix. Dále byla identifikována exprese nenádorových T-lymfocytů (5).

V roce 2002 byla publikována práce navazující na Alizadeha, která identifikovala kromě GC-like a ABC-like DLBCL podtypů ještě skupinu třetí, která neexprimovala geny ani jedné z uvedených skupin (6). Byla označena jako „typ 3“. Celkové pětileté přežití bylo 60% ve skupině GC-like, 39% ve skupině typ 3 a 35% ve skupině ABC-like DLBCL. V téže práci bylo zjištěno, že některé cytogenetické charakteristiky, pokud se vyskytují, jsou vázány pouze na skupinu GC-like, jako např. translokace t(14;18) přemísťující *Bcl2* gen pod enhancer těžkého imunoglobulinového řetězce nebo amplifikace *c-rel* lokusu na chromozomu 2p. V nádorové tkáni byly kromě GC-like-, ABC-like- a typ3 signatur navíc identifikovány signatury *MHC II* (*HLA-DP*, *HLA-DQ*, *HLA-DR* geny), lymph-node signatura (α -aktinin, různé typy kolagenů, fibronektin, atd.) a tzv. proliferáční signatura (např. *c-myc*). GC-like, *MHC II* a lymph-node signatury byly spojeny s příznivou prognózou, proliferáční signatura a exprese genu *Bmp6* s prognózou špatnou. S použitím 16 genů vybraných z uvedených buněčných programů a samostatně stojícího genu *Bmp6* byl sestaven tzv. prognostický prediktor. Tento prediktor přiřazoval pacientům na základě exprese jednotlivých genů určité skóre, na základě kterého byli pacienti rozděleni do kvartilů a v jednotlivých kvartilech bylo vyhodnoceno celkové přežití. Takto použitý prediktor a IPI byly nezávislými prognostickými indikátory DLBCL.

V roce 2003 byla v rámci diagnózy DLBCL geneticky definována podskupina PMBL (7). Obecně se předpokládá, že PMBL vychází z CD19+/CD21- tymických medulárních buněk (2,8), ovšem na nemaligní buněčný korelát tohoto tumoru existuje názorů více. Objevují se i práce, které dávají jeho původ do souvislosti s malignizací buněk buď v germinálním centru lymfatické uzliny či po jeho opuštění tak, jak to vidíme obecně u DLBCL (9,10).

V citovavé studii bylo nejprve vybráno několik pacientů s klinicko-patologickou diagnózou PMBL do tzv. testovacího souboru. Všichni tito pacienti měli histologicky potvrzenou diagnózu DLBCL a splývající mediastinální nádorovou masu minimálně 6 cm v nejmenším rozměru. Na testovacím souboru byla vyšetřena genová exprese a určena signatura typická pro PMBL. Z ní bylo vybráno celkem 46 genů, které svou expresí nejlépe

odlišovaly PMBL od DLBCL. Sestava těchto genů, tzv. prediktor, byla ověřována na větší skupině pacientů, tzv. validačním setu se současným zpětným testováním setu testovacího. Ze všech 46 pacientů, u kterých byla společně v obou setech klinicky předpokládána diagnóza PMBL, zařadil prediktor do skupiny PMBL na základě genové exprese 76% pacientů. To znamená, že čtvrtina pacientů s klinickými projevy PMBL nenesou odpovídající genovou signaturu, přičemž není možno tuto skupinu odlišit jinak než vyšetřením na genových čípech. Klinicky měla tato diskrepantní skupina tendenci k agresivnějšímu průběhu onemocnění a horší prognóze. Když byli prediktorem určení PMBL pacienti analyzováni podle schématu rozřazujícího do skupin GC/ABC, část byla zařazena jako GC, druhá část zůstala neklasifikována. Nikdo z PMBL pacientů nepřípadl do ABC podskupiny. PMBL signatura si je tedy bližší s GC podtypem DLBCL. Pětileté přežití pacientů bylo nejlepší ve skupině PMBL (64%), dále ve skupině GC (58%), nejhůře na tom byli pacienti ze skupiny ABC (30%). Vzhledem k lepší prognóze geneticky určených PMBL pacientů se ukazuje jako významné umět tyto pacienty dobře odlišit.

PMBL vykazuje některá genetická specifika. Je to především povšechně snížená buněčná signalizace závislá na B-buněčném receptoru (BCR). Je tak snížená exprese např. u genů *Blk*, *Nfat*, *Sab* (6,11). Dále bývá typicky snížená exprese povrchových imunoglobulinů přes přetrvávající expresi CD79a. Signály podporující maligní růst jsou zprostředkovány *Jak2/Stat* signalizační kaskádou, která v konečné fázi vede k aktivaci faktoru *NFκB* a která je pravděpodobně udržována v trvale aktivním stavu na několika úrovních. Zaprvé jde o overexpresi receptorové molekuly *IL-13Ra1*, která stojí na počátku zmíněné signalizační cesty. Zadruhé jde o snížené odbourávání aktivní formy *Jak2* kinázy, jednak z důvodu častých mutací jejího inhibitoru genu *Socs*, jednak pravděpodobně přispívá i genová amplifikace *Jak2*. Zatřetí zvýšeně exprimovaný *Traf1* gen inhibuje apoptózu a vede buňku ke zvýšené aktivaci *NFκB* (12,13). U PMBL bývá dále popisována zvýšená exprese např. u genů *Fig1*, *Mal*, *CD30*, *Pdl2* a dalších (11,14).

Zajímavý je vztah mezi PMBL a Hodgkinovým lymfomem (HL). Tyto dva nádory spolu sdílejí více než jednu třetinu genové exprese. Oba jsou typicky nádory mladých lidí, vznikají přednostně v mediastinu a oba často vykazují histologické rysy sklerotizace. Jsou známy případy pacientů, kteří po vyléčení jednoho z uvedených typů nádorů onemocněli druhým, i případy tzv. šedé zóny, kdy nádor sdílí histologické charakteristiky obou onemocnění současně (15). Spekuluje se nad dvěma možnými vysvětleními těchto jevů. Je možné, že oba tumory mají stejný buněčný prekurzor, tedy již zmíněnou thymickou medulární B-buňku, nebo že prekurzor je jiný, ale změny v genomu se týkají stejných

signalizačních cest a vedou tudíž k podobnému malignímu mechanismu. Toto druhé vysvětlení je podporováno faktem, že oba typy nádorů vznikají přednostně ve stejné lokalizaci a nabízí se tedy jako podnět k malignímu růstu vliv mikroprostředí dané anatomické lokalizace.

1.2. Klinika difuzního velkobuněčného a primárně mediastinálního B-lymfomu

1.2.1. Difuzní velkobuněčný lymfom

DLBCL postihuje převážně starší věkovou skupinu s mediánem sedmé věkové dekády v době diagnózy a je charakterizován agresivním průběhem s potenciální kurabilitou. Až 40% pacientů má v době diagnózy extranodální postižení, více než 50% zvýšenou hladinu laktátdehydrogenázy a zhruba v 15% bývá nádorem infiltrována kostní dřeň. Přibližně třetina pacientů má v době diagnózy celkové příznaky, tzv. B symptomy (febrilie, noční pocení, úbytek na váze) (16).

V predikci přežití pacientů má výsadní postavení mezinárodní prognostický index (IPI). V rámci IPI je hodnoceno celkem 5 nezávislých klinických charakteristik: věk, klinické stadium choroby v době diagnózy, hladina sérové laktátdehydrogenázy, výkonnostní stav a extranodální postižení.

V posledních letech byla dále publikována řada prognostických markerů vyšetřovaných buď na úrovni genů nebo proteinů, ať již analyzovaných jednotlivě nebo ve skupinách. Za prognosticky příznivý znak bývá považována např. exprese molekul *Lm02* (16), *CD23* (16), *Bcl6* (17), *CD21* (18) nebo *CD40* (16), s horším přežitím bývá spojována např. zvýšená exprese cyklinů D2 a D3, survivinu (18), *Fox2* genu (16) či ztráta exprese *MHC* komplexů I a II třídy (6). U mnohých jednotlivě posuzovaných markerů jsou údaje o jejich prognostickém významu nejednotné a výsledky jedné práce často nejsou potvrzeny prací jinou. Jedná se např. o molekuly *CD10*, *p27^{KIP1}*, *CD5* nebo *Bcl2*, kontroverzním prognostickým ukazatelem je i proliferační marker gen *Ki67* (18,19).

V roce 2004 byl publikován prognostický model založený na expresi šesti genů (20). V tomto modelu byly geny *Lmo2*, *Bcl6* a *Fnl* asociovány s dobrou prognózou, cyklin D2, *Scya3* a *Bcl-2* s horším přežíváním. Matematickým výpočtem beroucím v úvahu expresi všech šesti genů vyšetřenou pomocí RTqPCR (real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce) byli pacienti přiřazováni do prognostických skupin. Existují i další práce užívající kombinovaný model exprese několika genů. 13 genů využívá model M. Shippové (21), 16

genů model Jaise (22), 36 genů model Rimszy (23). Obecně ale platí, že s rostoucím počtem vyšetřovaných markerů je obtížnější zavést metodu do běžné praxe.

Někteří autoři rozdělují pacienty do prognostických skupin založených na různých kombinacích proteinů vyšetřovaných imunohistochemicky. V těchto schématech se často objevují molekuly odrážející různou zralost malignizujícího lymfocytu. Takto bývají uváděny např. *CD10*, *Bcl6*, *Irf4/Mum1* a *CD138* (24,25,26,27,28). S výjimkou algoritmu Hansové et al. (28, viz níže) se ale v dosavadní praxi žádné schéma neujalo. Schéma Hansové bylo navíc v roce 2009 rozšířeno o další geny (viz dále). Jsou publikovány dále i postupy využívající imunohistochemii jiných proteinů, např. koexpresi *c-Myc* a *p53*, spojenou s velmi agresivním průběhem onemocnění (29).

1.2.2. Primárně mediastinální B-lymfom

PMBL typicky postihuje mladé ženy ve třetí až čtvrté dekádě života (2,30). V úvodních projevech je obvyklá mediastinální nádorová masa (často nad 10cm), lokální invazivita do plic, pleury, perikardu a hrudní stěny a elevace sérové laktátdehydrogenázy (LDH) nad referenční meze (2,3,8,15,30,31). Postižení kostní dřeně či CNS je v době diagnózy vzácné, ale v případě relapsu je častý rozsev do extranodálních oblastí, např. do ledvin, ovárií, CNS a dalších orgánů (2,3,15). Proti klasickému DLBCL jsou tedy pro PMBL klinicky typické především průkaz nádorové mediastinální masy s lokální invazivitou (plíce, pleura, perikard, hrudní stěna). Podbrániční postižení je ve srovnání s DLBCL méně časté, vstupně bývá elevace LDH, kostní dřeň však infiltrována nebývá. V současné době je PMBL považován za onemocnění s lepší prognózou než klasický DLBCL (15).

V histologickém vyšetření má PMBL obdobný vzhled jako klasický nemediastinální DLBCL (dále jen DLBCL). Může se objevit i fokální nodularita, Reed-Sternberg-like buňky a výrazná sklerotizace nádoru. Tyto znaky však nejsou stoprocentně spolehlivé a PMBL tak zůstává klinicko-patologickou diagnostickou jednotkou (3).

Nádor exprimuje typické B-antigeny (*CD19*,*CD20*,*CD22*), ale obvykle postrádá povrchové imunoglobuliny i přes expresi koreceptoru *CD79a*. Časté jsou také chromozomální amplifikace 9p (*Jak2* gen) a 2p (*c-rel*) (5,31,32,33).

V pilotních studiích byl uváděn agresivní průběh onemocnění a horší prognóza než u DLBCL, v současné době je ale PMBL považován za prognosticky příznivější variantu. Diskrepance výsledků dřívějších a nynějších prací je vysvětlována obtížností diagnostiky PMBL.

1.2.3. Terapie DLBCL/PMBL

Standardní léčbou DLBCL/PMBL je antracykliny obsahující chemoterapeutický režim kombinovaný v posledních několika letech s rituximabem (protilátka anti-CD20).

Alternativně bývá do léčebných postupů zařazována radioterapie na místa původního tzv. bulky postižení (tzn. přítomnost nádorové masy, dle různých autorů o rozměrech 5-10cm) a autologní transplantace periferních kmenových buněk. Použití těchto postupů závisí na konkrétním léčebném protokolu, odpovědi pacienta na úvodní léčbu a v neposlední řadě i na zvyklostech pracoviště (1).

1.3. Diagnosticky využívané metody

Veškeré výše uvedené analýzy vedoucí k rozdělení genetických podtypů DLBCL byly provedeny s využitím genových čipů, microarrayí. Na jedné straně umožňují tato vyšetření současnou analýzu tisíců genů z jednoho vzorku a umožní jejich zpracování zacílené na změny exprese od jednotlivých genů přes konkrétní signální cesty až po studium rozsáhlých celistvých buněčných genových programů. Na druhé straně jsou tato vyšetření technicky velmi náročná. Vyžadují RNA vysoké kvality získané z čerstvě zmražené tkáně. Jak získání této tkáně na chirurgickém sále, tak následná kontrola patologem, zda zmražený vzorek obsahuje požadovanou nádorovou tkáň v odpovídající kvalitě, i trvalé uchování vzorku v tekutém dusíku jsou organizačně náročné kroky. Následné finančně nákladné vyšetření každého jednotlivého vzorku znemožňuje uvedení microarray technologií do rutinní praxe. Jsou proto hledány alternativní postupy, které by byly schopné s větší či menší chybou vyšetření čipy nahradit. Běžně využívané techniky jsou v takových případech imunohistochemie (př. 27,28) a RTqPCR (př. 20).

Výhodou čipové analýzy je možnost charakterizovat v celostním pohledu právě přítomnou genovou expresi buňky v konkrétním časovém okamžiku, za daných a případně laboratorně ovlivňovaných podmínek. Simultánně lze vyšetřit genovou expresi třeba i všech známých genů daného organismu. Čipové vyšetření je možné provádět i za jinými účely než vyšetření genové exprese – např. vyšetření chromozomálních změn, SNP (single nucleotide polymorphism), epigenetické změny a další. Základním principem vyšetření je hybridizace nukleových kyselin (DNA, cDNA získaná z RNA) izolovaných ze vzorku zájmu a značených detekabilním způsobem s komplementárními řetězci nukleových kyselin nanesených na

vhodný nosič. Tato komplementární oligonukleotidová vlákna reprezentují známé genové sekvence a jsou nanasena např. na nylonových membránách nebo skleněných destičkách. Detekabilní značení bývá radioaktivní (P32/33), značení pomocí haptenu (biotin, digoxigenin, aminoallyl) nebo fluorescenční (Cy3, Cy5). Detekce je dle způsobu značení pak autoradiografická, chemiluminescenční nebo fluorescenční. Komerčně jsou k dostání různé typy čipů – např. firmy Affymetrix, Illumina, Agilent. Čipy mohou být zaměřeny buď na konkrétní biologickou úlohu (např. apoptóza) nebo na genom konkrétního organismu, a to v různém rozsahu. Výsledek vyšetření genové exprese pomocí mikroarray technologie je relativní a porovnává sledované vzorky mezi sebou (34).

1.3.1. Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je schopna částečně vyřešit problém vstupního materiálu, protože převážně pracuje s běžně dostupným, archivním parafinovým blokem (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, FFPE). Na druhé straně, expresní genové profily jsou vyšetřovány na úrovni mRNA, zatímco IHC vyšetřuje odpovídající protein. Hladiny mRNA a proteinů ovšem ne vždy korespondují a neplatí plně ani předpoklad, že hladina proteinu coby efektoru lépe odpovídá dějům v buňce. Rozhodující roli zde hrají degradační poločasy proteinů.

Patolog si při vyšetřování pozitivitu jednotlivých markerů všímá především dvou parametrů – procenta pozitivních sledovaných buněk (v našem případě nádorových) a intenzity barvení markeru. Dle obecných postupů patologů je vzorek označen jako pozitivní, je-li v daném barvení pozitivních aspoň 10% sledovaných buněk. Pod touto hranicí 10% je vzorek považován za pro daný marker negativní. V některých algoritmech je však možno vidět i hranice jiné, např. 30% (28). Intenzita barvení se zpravidla popisuje stupnicí 1 až 3, případně barvením na 1 až 3 kříže.

Jak určování procenta pozitivních buněk, tak popis intenzity barvení s sebou přinášejí úskalí, na která je naráženo ve vyhodnocování výzkumných projektů.

Prvním problémem je obtížná kvantifikovatelnost výsledku. V mnohých výzkumných projektech je nespojitý údaj pozitivní/negativní nedostatečný a je snaha ho nějakých způsobem rozšířit a tak přiblížit detailnějším statistickým analýzám. Obecně se lze v literatuře setkat se dvěma přístupy řešení tohoto problému:

1) tzv. semikvantitativní vyhodnocení jednotlivých preparátů (35). V každém vzorku je spočítáno procento pozitivních buněk a vzorky jsou rozděleny do skupin - např. skupina 1 (10-25% pozitivních buněk), skupina 2 (25-75%) a skupina 3 (nad 75% pozitivit). Eventuálně je možno vzít v úvahu intenzitu barvení jednotlivých markerů popsanou stupnicí 1 až 3.

2) vyhodnocení pomocí klasifikačních algoritmů a schémat (viz níže algoritmus klasifikace DLBCL).

Dalším problémem je kolísavá intenzita barvení jednotlivých markerů, která je mezi jednotlivými laboratořemi zcela nesrovnatelná. V některých publikovaných studiích je intenzita vyšetření brána v potaz (např. 35, viz dále). Problém nestabilní intenzity vyšetření je možné při dostupnosti potřebného vybavení vyřešit použitím tzv. tkáňových mikroarray (TMA). Při tomto vyšetření jsou v celé skupině bloků nejprve na hematoxylin-eosinových preparátech identifikovány nejreprezentativnější oblasti vzorku a ty jsou následně z bloku vyříznuty. Takto získané fragmenty všech bloků v celé vyšetřované skupině jsou pak spojeny do bloku jednoho, ten je nakrájen a obarven příslušnou protilátkou. Tím je dosažena uniformita barvení v celém studovaném souboru. Technické vybavení pro TMA je však velmi nákladné a většina běžných patologií jím nedisponuje.

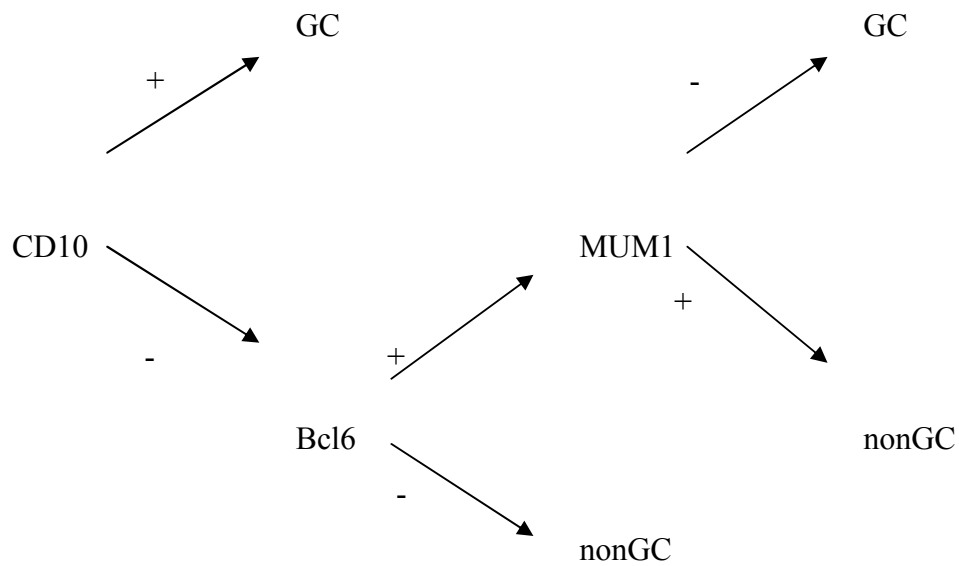
Narážíme i na relativně špatnou reprodukcibilitu IHC vyšetření, především pokud je prováděno v různých laboratořích. Hlavním důvodem jsou technické variability v jednotlivých protokolech, odlišné mezi jednotlivými laboratořemi (36).

IHC klasifikační algoritmus pro DLBCL

Pro rozdělení DLBCL na GC/ABC/typ3 podskupiny bylo navrženo několik imunohistochemických schémat. Nejznámější je algoritmus Hansové (28), využívající barvení proteinů *CD10*, *Bcl6* a *Mum1/Irf4* (obr.1). Vzhledem k tomu, že typ3 DLBCL nemá žádný charakteristický expresní znak, nebylo možno ho v IHC odlišit žádným vhodným markerem a skupina typu 3 splynula v algoritmu se skupinou ABC. Algoritmus tak rozlišuje skupiny dvě, a to GC- a nonGC (ABC+typ3). Shoda IHC algoritmu s vyšetřením na genových čípech byla 80% (71% pro GC skupinu a 88% pro skupinu nonGC), IHC schéma však v dané studii prokázalo lepší prognostickou predikci než microarraye. Pacienti v GC skupině měli pětileté přežití 76% oproti 34% u pacientů ve skupině nonGC. IHC schémata jiných autorů jsou zmíněna výše (např. 27). Uvedené schéma Hansové bylo v roce 2009 dále rozšířeno o další geny, *Gcet* a *Foxp1* (37).

Co se týče IHC odlišení PMBL podskupiny, žádné obecné schéma neexistuje. Jsou uváděny postupy využívající např. barvení proteinů *Mal*, *Stat* či *Traf* (38,39). Jejich pozitivita však u PMBL lymfomů není konstantní a zařazení těchto markerů do rutinní praxe je problematické.

Obr. 1. Algoritmus dle Hansové et al. Nejprve je vzat v úvahu antigen *CD10*. Je-li pozitivní, nádor je zařazen do skupiny GC. Je-li *CD10* negativní, je vyhodnocen antigen Bcl6. Při jeho negativitě je vzorek řazen do skupiny nonGC, při *Bcl6* pozitivitě je vyhodnocen ještě antigen *Mum1*. Je-li pozitivní, spadá vzorek do skupiny nonGC, je-li negativní, pak do skupiny GC. Hranice pozitivity je v uvedeném schématu u jednotlivých markerů 30 % buněk.



1.3.2. RTqPCR

RTqPCR vyšetřuje menší množství genů než čipy, je výrazně levnější a proti čipům má lepší kvantifikační přesnost. Jako vstupní materiál pro izolaci RNA bývá běžně používána čerstvě zmražená tkáň.

Chceme-li vyšetřovat RNA z archivního FFPE materiálu, narážíme na zásadní problém degradace a chemické modifikace nukleových kyselin, ke kterým dochází během zpracování vzorku do parafinového bloku. Přestože poprvé byla RNA z archivního vzorku analyzována již v roce 1988 (40), v praxi pro technickou náročnost metod tyto analýzy běžně rozšířeny nejsou. V naší laboratoři se v letech 2005-2007 podařilo vyšetření genové exprese z FFPE tkání pomocí RTqPCR zavést (viz dále, (41)). Při použití tohoto materiálu je nespornou výhodou i možnost retrospektivní analýzy klinických dat pacientů.

Celá metoda vyšetření genové exprese pomocí RTqPCR sestává z několika kroků:

1. Izolace nukleové kyseliny, v našem případě RNA.
2. Kontrola její kvality.
3. Reverzní transkripce RNA do komplementární DNA, tzv. cDNA.
4. Provedení a analýza vlastní PCR reakce.

Vzhledem ke skutečnosti, že metoda byla během postgraduálního projektu zaváděna a výsledky optimalizace jsou zohledněny ve výsledcích práce, bude jí v následující části úvodu věnován podrobnější výklad.

Ad 1. Izolace RNA

Základním protokolem izolace RNA z čerstvé tkáně je tzv. Chromczynského guanidin-fenol-chloroformová (GFCH) metoda (42). Buňky, jejichž RNA chceme izolovat, nejprve lyzujeme pomocí lyzačního roztoku. V dalších krocích se poté RNA váže ve vodné části fenol-chloroformové emulze, sráží v izopropanolu a promývá etanolem. V konečné fázi izolace získáváme RNA zbavenou proteinů a anorganických iontů a rozpouštíme ji ve vodě. Většina v současnosti užívaných izolačních protokolů i komerčních izolačních kitů z této metody vychází.

Poznámky pro FFPE materiál

Existuje rovněž modifikace metody pro izolaci RNA z FFPE tkáně. Zde je vlastní izolaci předsunut deparafinizační krok. Po nakrájení parafinového bloku na tenké řezy (10 μm) je odstranění parafínu provedeno krátkou inkubací s xylenem. Poté se pokračuje způsobem obdobným jako při použití čerstvé tkáně. Byly vyvinuty i komerční kity pro práci s RNA z FFPE tkáně. Nami používaný kit firmy Roche (viz dále) je založen na izolaci nukleové kyseliny pomocí kolon ze sklených vláken, kdy reakce probíhají za vyhovujících koncentrací solných roztoků.

Izolace RNA z FFPE řezů má určitá specifika, na která je nutno brát zřetel, chceme-li dosáhnout úspěšné analýzy genové exprese. Zásadními problémy jsou především degradace RNA až na fragmenty o velikosti 200 bp (43) a vznik tzv. zkřížených vazeb (cross-linking) s ostatními molekulami nukleových kyselin a proteinů (44). Tyto vazby vznikají následkem inkubace tkáně ve formalinu, která umožní vznik tzv. metylolových skupin. Vzájemnou reakcí těchto skupin na různých makromolekulách dochází postupně k ireverzibilní vazbě a zesíťování nukleových kyselin a proteinů. První problém, tedy fragmentace RNA, je řešen vhodným výběrem primerů tak, aby amplifikované fragmenty DNA nepřekročily délku 100 bp, pokud je to možné. Uvolnění RNA z vazeb na ostatní složky tkáně je realizováno inkubací s Proteázou K. Kromě uvolnění RNA z vazeb má Proteáza K další důležitou roli, a to degradaci endogenních nukleáz. Tímto účinkem chrání RNA uvolněnou z vazby před enzymatickou digescí.

Ad 2. Kontrola RNA kvality. (Zdroj informací: Kurz kvantitativní PCR, ÚHKT, 2005):

Kontrola kvality RNA izolované z čerstvé tkáně je běžně dvojitá:

1. elektroforetická (obr. 2). Během elektroforézy (např. agarózové) detekujeme na čele elektroforézy pruhy odpovídající 5S rRNA, dále směrem ke startu elektroforézy dva pruhy RNA, odpovídající eukaryotické 18S a 28S rRNA. Nejsou-li tyto pruhy zřetelně odlišitelné a na gelu se objevuje souvislý pruh RNA fragmentů, tzv. smear, jedná se o degradaci RNA a takový vzorek by neměl být dále zpracováván. mRNA je na elektroforéze zobrazena jako zvýrazněný signál mezi pruhy 28S a 18S. Případná kontaminující DNA zůstává na startu elektroforézy.

2. spektrofotometrická. Absorbance nukleových kyselin (RNA i DNA) je nejvyšší při vlnové délce 260 nm. Při vlnové délce 280 nm absorbují především proteiny, absorbance nukleových kyselin je zde přibližně poloviční ve srovnání s absorbancí při 260 nm. Proto by měl optimální poměr absorbance čisté RNA 260/280 činit 2 (1,9-2,1). Pro provedení kvalitní RTqPCR jsou dle zkušeností přípustné hodnoty poměru v rozmezí 1,5-2.

Spektrofotometrická analýza umožňuje rovněž stanovit koncentraci vzorku. Počítá se pomocí rovnice:

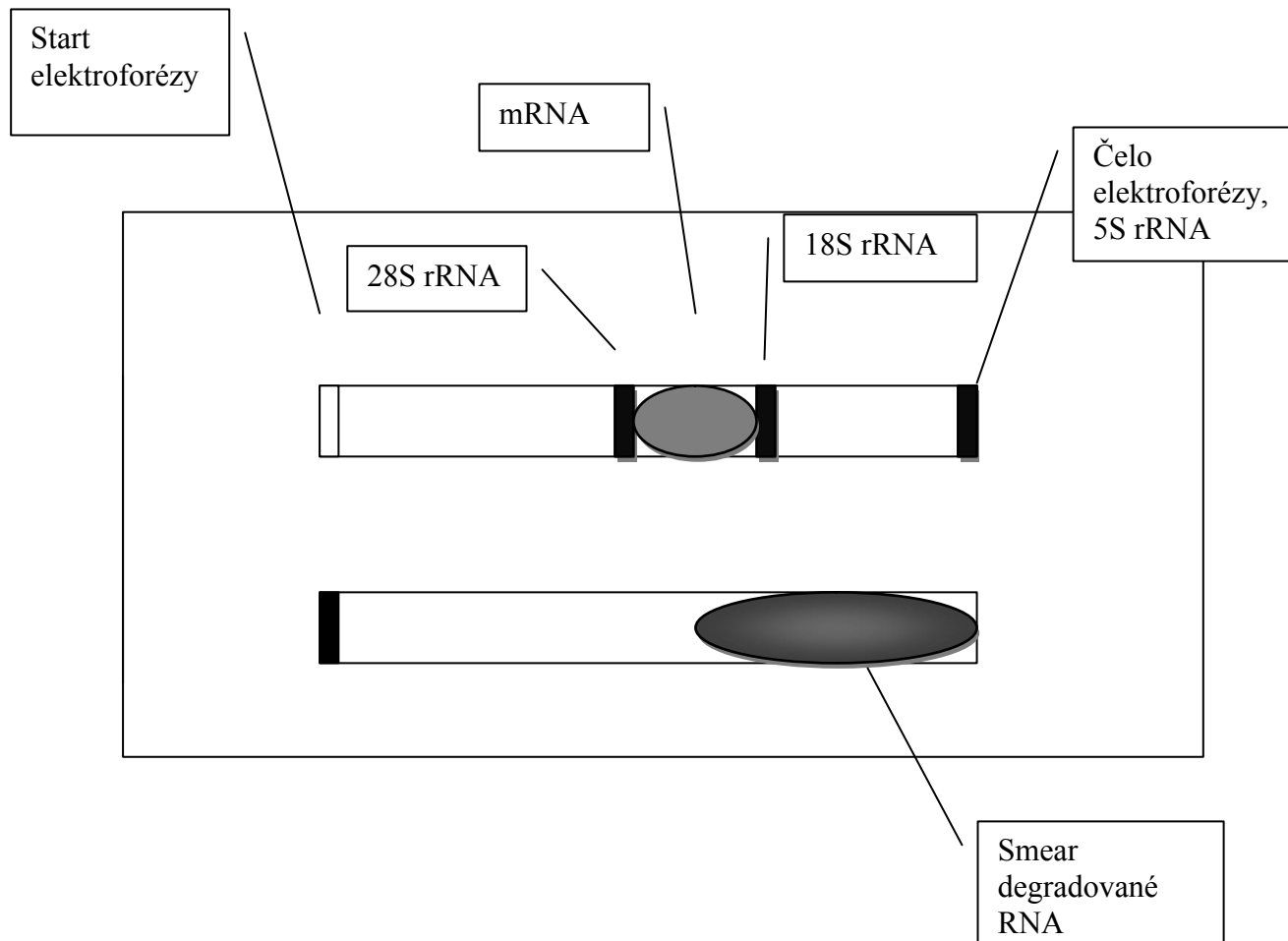
$$c = A_{\text{RNA}} \times F \times \lambda_{260}, \text{ kde}$$

c je výsledná koncentrace RNA vzorku v ng/ μ l, A_{RNA} je extinkční koeficient – pro RNA odpovídá hodnotě 40 (tzn. vodný roztok RNA má ve vlnové délce 260 nm absorbanci 1 při koncentraci RNA 40 ng/ μ l), F je faktor ředění a λ_{260} odpovídá absorbanci vzorku při vlnové délce 260 nm.

Poznámky pro FFPE materiál

Při práci z FFPE vzorky není elektroforéza přínosná pro vysoký stupeň degradace RNA. Spektrofotometrie může být provedena, nicméně spektrofotometrické hodnoty jsou nižší než při analýze čerstvé tkáně (45). Bližší analýzy výsledků spektrofotometrie u FFPE materiálu ve světové literatuře chybí.

Obr. 2. Schéma elektroforézy RNA na agarovém gelu. Horní vzorek kvalitní – start bez kontaminace DNA, pruhy všech tří rRNA i oblast mRNA přítomna. Spodní vzorek nekvalitní – kontaminace DNA na startu, degradace RNA.



Ad 3. Reverzní transkripce RNA do komplementární DNA, tzv. cDNA.

Reverzní transkripce je metoda, kterou nestabilní molekulu RNA převádíme do stabilnější struktury DNA. Protože reakce probíhá až po sestřihu pre-mRNA buněčným enzymatickým aparátem a molekula zralé mRNA tudíž již neobsahuje introny, neshoduje se námi získaná DNA sekvenčně s původní molekulou genomické DNA. Naopak, je komplementární se sestřihanou mRNA, odtud název komplementární DNA a zkratka cDNA. cDNA je v následných PCR reakcích při opakovaných teplotních změnách stabilnější než RNA (46).

Reverzní transkripci provádíme pomocí enzymů zvaných reverzní transkriptázy. Jejich činností vzniká přepisem RNA templátu DNA molekula. Mají virový původ a na trhu je jich dostupných více druhů, např. MMLV (Moloney murine leukemia virus) nebo AMV (Avian myeloblastosis virus) (46).

Reverzní transkriptáza potřebuje zahájit přepis na krátkém oligonukleotidu, tzv. primeru. Existují tři tzv. priming strategie pro reverzní transkripci: (Zdroj informací: Kurz kvantitativní PCR, ÚHKT, 2005.)

1. Oligo dT primery. Jsou užívány k reverzní transkripci mRNA molekul. Ty jsou, na rozdíl od ostatních RNA molekul (rRNA, tRNA) opatřeny polyadenylovým koncem. Tato metoda je založena na komplementaritě adeninu (A) a thyminu (T). Je univerzální pro mRNA, ale výtěžek je nižší ve srovnání s použitím následující metody.

2. Směs náhodných hexamerů až dekamerů. Jedná se o směs všech existujících kombinací čtyř základních bází nukleových kyselin v oligonukleotidových řetězcích o 6-9 bázích. Zcela náhodně nasedají na molekuly přítomné RNA dle principu komplementarity bází. Tato metoda je univerzální s vysokým výtěžkem vzniklé cDNA.

3. Gen specifický primer, který přepisuje pouze RNA genů zájmu.

Poznámky pro FFPE materiál

Adenin je ve srovnání s ostatními bázemi nejcitlivější na vznik metylolových vazeb. Z tohoto důvodu se u FFPE materiálu obecně nedoporučuje používat oligo dT primery (44, 50,51), ačkoli byly publikovány výsledky práce, kde byly uvedené primery použity s úspěchem (52).

Ad 4. Provedení a analýza vlastní PCR reakce (47)

Polymerázová řetězová reakce umožňuje amplifikaci (v ideálním případě exponenciální) genu našeho zájmu. Základní myšlenka reakce předpokládá, že pokud máme vstupně jen několik málo kopií genu, které nejsme dostupnou technikou schopni detekovat, pak se pravděpodobnost detekce příslušného genu zvýší, pokud uměle jeho vstupní malé množství amplifikujeme. Pravděpodobnost časně detekce stoupá s rostoucím počtem kopií genu ve vstupním vzorku a efektivitou reakce.

Princip reakce je následující: Do reakce vstupuje genomická nebo komplementární DNA, tedy gDNA nebo cDNA. Na počátku reakce je tato molekula při teplotě cca 95°C denaturována na svá jednotlivá a oddělená komplementární vlákna. Při poklesu teploty cca k 55°C nastává tzv. anelace, tedy sekvenčně specifické přiložení primerů ke každému vlákně DNA, na kterém je přítomna komplementární sekvence. Ve třetím kroku při teplotě 72°C začíná enzym polymeráza (zpravidla Taq polymeráza izolovaná z *Thermophilus Aquaticus*) na volném konci anelovaného primeru doplňovat vlákno DNA dle principu komplementarity bází. Na konci tohoto kroku máme tedy z původního jednoho DNA dvojitá vlákna dvě nové dvouvláknové molekuly DNA. Celý tento tříkrokový proces je opakován, zpravidla 30 – 40x.

Reakce je popsána rovnicí:

$$Y = N(1+E)^n, \text{ kde}$$

Y je amplifikační faktor, N je vstupní počet kopií genu, E je efektivita reakce a n je počet amplifikačních cyklů.

Teoreticky reakce probíhá exponenciálně, v praxi ale dosahuje po určitém počtu proběhlých cyklů fáze plató. Důvodem je vyčerpání reakčních složek i nevyhnutelná přítomnost inhibitorů Taq polymerázy v reakční směsi.

Počet cyklů obvykle nepřesahuje 40 ze dvou důvodů. 1. Dosažení fáze plató je prakticky vždy před 40. cyklem a další protahování reakce je již velmi málo efektivní, 2. je-li ve vstupním vzorku pouze jedna kopie genu zájmu, dostane se při současných technických možnostech na hranici detekability přibližně v 37. cyklu (53).

Rozlišujeme dva základní typy PCR reakce:

1. Kvalitativní, tzv. end-point PCR, ve které po proběhlé reakci provádíme detekci PCR produktů elektroforeticky. Zpravidla je výsledkem vyšetření odpověď ANO, gen přítomen nebo NE, gen nepřítomen. Za použití speciálních softwarů je možné provést kvantifikaci výsledku, je to ale postup technicky velmi náročný a zdlouhavý.

2. Kvantitativní, tedy real-time kvantitativní PCR, RTqPCR. Tato metoda detekuje postupně narůstající množství PCR produktů již aktuálně v průběhu reakce, obvykle po každém cyklu. Detekce je založena na fluorescenci určitých reakčních složek. Rozlišujeme dva základní typy fluorescenční detekce (48):

a) nespecifickou – typickým zástupcem je interkalační barvivo SYBR green. Tato molekula interkaluje do dvouvláknové molekuly nukleové kyseliny zcela nezávisle na její sekvenci. Pokud je interkalovaný SYBR green ozářen paprskem vhodné vlnové délky, odpoví fluorescenčním zářením. Neinterkalovaný SYBR green fluorescenci nevykazuje. Jak v průběhu PCR reakce narůstá množství PCR produktů, narůstá po každém cyklu i zastoupení interkalovaných SYBR greenových molekul a tím i detekovaná fluorescence. Velkou nevýhodou této detekce je nespecifita a tudíž vysoká náročnost na optimalizaci reakce tak, aby v ní nevznikaly žádné nespecifické produkty amplifikace.

b) sekvenčně specifickou – typickým zástupcem jsou tzv. Taqman sondy, jak byly pojmenovány v prvních pokusech. Taqman sonda je sekvence přesně komplementární k části genu našeho zájmu. Na jednom konci je opatřena fluorescenční molekulou, na druhém tzv. zhášečem fluorescence. Pokud je sonda kompletní, fluorescenci nevykazuje. Během reakce je v každém cyklu zařazen krok, kdy sonda v kompletní podobě nasedne ke své komplementární sekvenci, a to do pozice za primerem. Taq polymeráza rozpozná primer a začne syntetizovat nové vlákno DNA. Jakmile se během syntézy dostane až k místu, kde leží sonda, začne ji svou exonukleázovou aktivitou štěpit, aby sama mohla pokračovat v tvorbě komplementárního vlákna. Rozštěpením sondy dojde k uvolnění fluorescenčního barviva od zhášeče a barvivo se tak stane aktivním. S rostoucím počtem cyklů PCR roste množství rozštěpených Taqman sond a tím narůstá fluorescence detekovaná v průběhu celé PCR reakce (48).

Výsledek RTqPCR a kvalita reakce

Výstupem RTqPCR jsou fluorescenční křivky, jak uvedeno např. na obr. 6, viz dále. Zásadní význam pro odečtení výsledků má tzv. threshold linie (horizontální linie v obrázku). Tato linie je manuálně nastavitelná a pokládá se do místa, kde je průběh fluorescenčních křivek exponenciální. V místě průsečíku threshold linie a fluorescenční křivky genu získáváme tzv. Ct hodnotu genu (hodnota PCR Cyklu, kterou prochází threshold linie). S Ct hodnotami jednotlivých genů pracujeme při kvantifikaci výsledku (viz dále).

Při detekci pomocí SYBR green je dále stěžejní, aby se v reakci netvořily tzv. dimery primerů. Vznikají tak, že se jednotlivé oligonukleotidy primerů přikládají k sobě navzájem aspoň částí svých sekvencí. Taq polymeráza poté řetězec dotvoří na základě komplementarity bazí. SYBR green se pak váže i v těchto DNA úsecích a uměle tak zvyšuje fluorescenci snímanou ze specifických genových úseků.

V RTqPCR platí některé obecné zásady:

1. nižší hodnota Ct znamená vyšší počet kopií genu ve vstupním vzorku,
2. rozdíl jednoho cyklu v Ct hodnotách dvou genů odpovídá velmi přibližně dvounásobnému rozdílu počtu vstupních kopií (53).

Kvalita RTqPCR experimentů je určována nízkými Ct hodnotami genů, strmostí fluorescenčních křivek, dosaženou fluorescencí a homogenitou vyšetřených duplikátů/triplikátů každého vzorku. V reakcích se SYBR greenem se dále nesmí tvořit dimery primerů (48).

Kvantifikace výsledků metody RTqPCR (49)

Obecně rozlišujeme dva základní přístupy ke kvantifikaci RTqPCR výsledků:

a) absolutní kvantifikace. V této metodě se ptáme na přesný, absolutní počet kopií sledovaného genu ve vzorku. Vychází se ze zhotovení tzv. standardní/kalibrační křivky. Obvykle se v praxi provádí tak, že se v několika stupních ředění naředí roztok určitého plasmidu o známé výchozí koncentraci. Tento plasmid nese námi sledovaný gen. Jelikož známe stupeň ředění v každém kroku, známe i předreakční počet kopií genu v každém kroku ředící řady. Z těchto hodnot zhotovíme kalibrační křivku. Po vyšetření zkoumaného vzorku vyneseme získanou hodnotu fluorescence do grafu kalibrační křivky a odvodíme absolutní

vstupní počet kopií sledovaného genu ve vzorku. Aby bylo možno relevantně provést absolutní kvantifikaci a srovnávat počet kopií genů mezi jednotlivými vzorky, musí být u všech vzorků zaručeno stejné vstupní množství vyšetřovaného materiálu. Tato metoda kvantifikace je tedy vhodná např. pro buněčné suspenze, kde je možné změřit koncentraci buněk a tím zajistit stejné vstupní množství buněk u každého vzorku, nebo u čerstvě zmraženého materiálu, kde můžeme vstupně použít např. vzorky o konstantní hmotnosti.

b) relativní kvantifikace. Využívá se především tam, kde absolutní kvantifikace není možná, např. u FFPE tkáně, kde je prakticky nemožné zajistit stejné vstupní množství jednotlivých vzorků. Relativní kvantifikace vyšetří vždy dva typy vzorků – sledovaný vzorek zájmu a nějaký vzorek standardní. Standardní vzorek bývá např. tzv. „poolovaný normál“, tzn. RNA získaná a smíchaná z izolace např. periferních leukocytů většího počtu dárců, nebo lze použít i komerčně dodávané standardní RNA, které vycházejí z určitých buněčných linií a jejich genová exprese je přesně definovaná a neměnná. U obou vzorků (tedy vzorku zájmu a standardu) vyšetříme jednak námi sledované geny a dále jeden nebo více tzv. housekeepingových genů. Jsou to geny zajišťující základní funkce buněčného metabolismu a jsou aktivní ve všech buňkách. Protože jsou pro činnost a viabilitu organismu zcela zásadní, předpokládá se, že jejich exprese je v jednotlivých buněčných typech relativně konstantní. Běžný způsob vyhodnocení relativní kvantifikace je tzv. $\Delta\Delta C_t$ metoda, která porovná rozdíl mezi expresí sledovaného genu a housekeepingového genu ve vzorku zájmu (tedy o kolik cyklů je amplifikace sledovaného genu pozadu nebo napřed ve srovnání s genem housekeepingovým) a tentýž rozdíl vyhodnotí i u RNA standardu. Následně se porovná rozdíl expresí housekeepingového a sledovaného genu mezi RNA standardu a vzorku zájmu. Máme-li tedy např. vzorek nádorové tkáně, ve kterém vyšetříme C_t housekeepingového genu 22 a C_t sledovaného genu 24, je rozdíl C_t genů 2 cykly. Pokud stejné geny vyšetříme v RNA standardu, bude C_t housekeepingového genu např. rovněž 22, C_t genu sledovaného 28. Rozdíl C_t je tedy 6 cyklů. Vidíme tedy, že ve sledovaném tumoru amplifikuje gen zájmu o 4 cykly dříve než ve standardu a podle rovnic $\Delta\Delta C_t$ metody (viz níže) je exprese tohoto genu v nádorové tkáni 2^4 , tedy 16krát vyšší než ve standardní RNA.

$\Delta\Delta C_t$ metoda:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{gen zájmu}}} - C_{t_{\text{housekeeping gen}}})_{\text{vzorek zájmu}} - (C_{t_{\text{gen zájmu}}} - C_{t_{\text{housekeeping gen}}})_{\text{RNA standard}}$$

následně spočítáme:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Výsledek nám říká, kolikrát je exprese sledovaného genu vyšší nebo nižší ve sledované tkáni v porovnání ve standardní RNA.

1.4. Geny vyšetřované v předkládané práci

1.4.1. Geny vyšetřované pomocí RTqPCR

Cílem práce je zlepšení diagnostiky podtypů NHL s využitím genové exprese. Jak již bylo uvedeno, vyšetření na genových čípech je schopné zjistit genovou expresi tisíce genů simultánně. Na základě mikroarray dat publikovaných jinými skupinami byly vybrány geny reprezentující jednotlivé zkoumané skupiny diagnóz, tedy PMBL a DLBCL. Typickými zástupci exprese PMBL byly geny *CD23* a *Pdl2*, skupinu DLBCL diagnóz reprezentuje v předkládané studii gen *Blk*:

CD23 (human leukocyte differentiation antigen, *Fcer2*) je důležitou molekulou v B-buněčné aktivaci a růstu. Je zvýšeně exprimována u PMBL ve srovnání s ostatními podtypy DLBCL (11).

Pdl2 gen (programme cell dech 1 ligand 2) je regulátorem T-buněčné odpovědi. Byly zjištěny jak proliferační, tak proapoptotické účinky genu, zřejmě v závislosti na typu ovlivňovaných receptorů. Je zvýšeně exprimovaný v PMBL i HL buňkách a je součástí často amplifikovaného lokusu 9p24 u obou těchto onemocnění. Minimálně u PMBL však amplifikace není jediným mechanismem overexprese, protože amplifikace je přítomna pouze u 23% tumorů, zatímco gen je zvýšeně exprimován téměř ve všech případech (15).

Blk (B-lymphoide tyrosine kinase) je tyrosinkináza ze skupiny *Src*-kináz, uplatňující se v BCR signalizační kaskádě. Její exprese je významně snížena v PMBL buňkách a zvýšena v buňkách DLBCL (11).

1.4.2. Vyšetřované imunohistochemické markery

CD20 je povrchový antigen B-lymfocytů a pro svou pozitivitu u tumorů vycházejících z B-lymfocytů patří k základním vyšetřovaným markerům hematologických malignit. Molekula hraje roli ve vývoji a diferenciaci B-buněk do buněk plasmatických (5).

CD5 je dalším standardně vyšetřovaným antigenem hematologických biopsií. Je pozitivní ve většině případů chronické lymfocytární leukémie a lymfomů z plášťové zóny (54). Biologická funkce antigenu není spolehlivě známa.

CD30 molekula patří do rodiny TNF-receptorů. Je exprimována aktivovanými T a B buňkami a jde o pozitivní regulátor apoptózy. Z hematologických malignit je známa jeho pozitivita u anaplastických velkobuněčných lymfomů, Hodgkinova lymfomu a PMBL. Ačkoli je barvení *CD30* pozitivní u většiny PMBL, je velmi slabé a jeho hodnocení svízelné (3,55).

CD23 pozitivní imunohistochemie je popsána přibližně u 70% PMBL a 15% DBLCL (56).

CD10 antigen byl zařazen do imunohistochemického vyšetření ze dvou důvodů. Jednak jako součást algoritmu IHC klasifikace DLBCL dle Hansové (viz výše), jednak v rámci metodiky určování vlivu nenádorového pozadí vzorků na celkově zjištěnou genovou expresi (viz dále).

Bcl6 (B-cell CLL/lymphoma 6) protein patří do skupiny transkripčních faktorů, konkrétně transkripčních represorů v B-buňkách. Jako takový má velmi komplexní vliv na genovou expresi buňky. Přítomnost *Bcl6* proteinu je nezbytná pro správné formování germinálního centra lymfatické uzliny. U DLBCL jsou známy jeho časté translokace a hypermutace, se kterými bývá spojována patogeneza tohoto onemocnění (57). Je součástí klasifikačního algoritmu dle Hansové.

Mum1/Irf4 (multiple myeloma oncogene 1 / interferon regulatory factor 4) je klasickým představitelem ABC/nonGC podskupiny DLBCL (5,28). Tento gen je důležitý pro vývoj a diferenciaci B-lymfocytu, uplatňuje se v přestavbě BCR receptoru i ve formaci germinálního centra (58,59). Pravděpodobně hraje roli v aktivaci a diferenciaci B-lymfocytu v reakci na prezentaci antigenu (60). U DLBCL bývá jeho exprese spojována se špatnou prognózou (27). Patří rovněž do DLBCL imunohistochemického klasifikačního algoritmu.

1.4.3. Molekula *CD10*

CD10 (MME, membrane metallo-endopeptidase), je považován za jeden z hlavních markerů zdravého germinálního centra i GC-like DLBCL podtypu (5,25,27). Co se týče exprese *CD10* a přežití pacientů, jsou výsledky prací konfliktní (18). Přestože převažují práce, podle kterých je *CD10* příznivým prognostickým markerem (61,62), existují i práce, které tyto výsledky popírají (63).

Vyšetření exprese *CD10* molekuly, ať již na úrovni genu či na úrovni proteinu, je velmi často používané v expresních studiích (5,6,28).

Na úrovni genu jde o jeden z hlavních markerů GC centra, který stojí obvykle na prvních úrovních tzv. klasifikačních stromů a jeho exprese má tedy velký vliv na zařazení vzorku do GC- nebo nonGC skupiny DLBCL.

Imunohistochemicky na úrovni proteinu patří mezi rutinně užívané IHC markery lymfomů vycházejících z lymfatických germinálních center a je to první protein v Hansové klasifikačním algoritmu DLBCL. Klasifikační význam této molekuly je tedy velký. Přesto můžeme narazit na jeden problém. *CD10* pozitivitu nemají ve vzorcích pouze buňky nádorové, ale nekonstantně i nenádorové buňky nádorového stromatu (36). Pokud vyšetřujeme imunohistochemii, můžeme tyto buněčné typy odlišit. Při vyšetřování genové exprese, ať již na čípech nebo pomocí RTqPCR, se však běžně postupuje tak, že se provede celý řez vzorkem a takto se zpracuje. Každý vzorek tak tedy obsahuje i nenádorovou příměs. Jsou dvě možnosti, jak ji minimalizovat. Běžně se do studií zařazují vzorky, které dosáhnout určité minimální procentuální zastoupení nádorových buněk ve vzorku, obecně uznávaná hranice je 80% (seminář Sigma-Aldrich, Praha 2007). Druhou možností je využití tzv. laserové disekce, kdy jsou pod mikroskopickou kontrolou z preparátu jednotlivě vyjmuty pouze nádorové buňky. Metoda je však drahá, pomalá a technicky velmi náročná.

Jelikož nenádorové stromální buňky v preparátech lymfomů mohou být *CD10* pozitivní (64), je součástí předkládané práce zhodnocení míry vlivu této nenádorové exprese na výsledky experimentů a relevanci výsledků.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

2.1 Hypotéza:

1. Klasifikace PMBL a DLBCL je možná pomocí dostupných metod, jako je např. RTqPCR, a je možné ji provést s pomocí limitovaného počtu genů.
2. FFPE materiál je materiál využitelný pro analýzu genové exprese.

2.2 Cíle práce:

1. Zavedení metody izolace RNA z parafinových tkáňových řezů a její analýza pomocí RTqPCR.
2. Zhodnocení vlivu nenádorového stromatu vzorků na měřenou genovou expresi tumoru.
3. Výběr reprezentativních genů odlišně exprimovaných mezi skupinami PMBL a DLBCL, a to s využitím světové literatury.
4. Klasifikace PMBL a DLBCL s využitím vybraných genů a výše uvedených technik.
5. Analýza klinických dat pacientů ve skupinách klinicko-patologických a geneticky definovaných diagnóz a vzájemné srovnání skupin.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Metody I

Stěžejní metody předkládané práce jsou dvě – RTqPCR a IHC. Pro obě techniky byl použit FFPE materiál. Zatímco v IHC byly barveny a hodnoceny již v minulosti zavedené markery, metodu vyšetření genové exprese z FFPE řezů bylo nejprve nutno zavést a optimalizovat. Metoda sestává z několika kroků: izolace RNA, ověření její kvality, provedení reverzní transkripce a provedení RTqPCR s fluorescenční detekcí a následnou analýzou genové exprese. Pro optimalizaci metody bylo použito nejprve 25 parafinových bloků od pacientů s DLBCL v tzv. testovacím setu. Na tomto setu bylo testováno zavádění metody a porovnávány jednotlivé kroky RNA analýzy převzaté z různých protokolů (viz níže). Počet použitých FFPE bloků v jednotlivých krocích testování se liší, bloky nebyly vždy použity všechny. Záměrně byly v rámci testovacího souboru zařazeny i bloky, ze kterých byla izolována RNA velmi nízké kvality. Na základě analýzy výsledků z testovacího setu byl sestaven optimální protokol jednotlivých kroků analýzy RNA a genové exprese, který byl ověřován v tzv. validačním setu na dalších 65 parafinových blocích. Ve stati „Metody I“ jsou uvedeny jednotlivé kroky optimalizace izolace RNA z FFPE a její analýzy, ve stati „Výsledky I“ pak konečný protokol.

3.1.1. Izolace RNA z parafinových bloků

Do testování izolace RNA bylo zařazeno celkem 8 parafinových bloků. Z každého z osmi bloků byly zhotoveny 4 paralelní vzorky k izolaci RNA, čímž bylo umožněno srovnání čtyř izolačních protokolů. Jednotlivé vzorky standardně obsahovaly čtyři parafinové řezy o tloušťce 10 μm .

Porovnávané protokoly pro izolaci RNA z FFPE tkáně:

1. Izolace pomocí kitu: High Pure RNA Paraffin Kit (Roche), který pracuje na podkladě filtračních kolon ze skleněných vláken ve specifických pufracích podmínkách. Bylo postupováno podle protokolu dodávaného výrobcem.

2. Klasická Chromczynského guanidin-fenol-chloroformová (GFCH) metoda: Každý vzorek byl deparafinizován v 500 μ l xylenu a 5 minut inkubován při pokojové teplotě (PT). Po odpipetování xylenu byla peleta promyta postupně ve dvou krocích v 1ml 100% a 75% etanolu. Poté bylo k peletě přidáno 850 μ l denaturačního roztoku (4M guanidin isothiokyanát – Sigma-Aldrich, 25mM natriumcitrát – Sigma-Aldrich, 0,5% sarkosyl – Serva, 0,1M 2-merkapttoetanol – Sigma-Aldrich), dále 25 ml proteinázy K (Roche) a 6 ml merkapttoetanolu. Vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě 55°C a 1200 rpm na vyhřívané třepačce, poté krátce stočeny a supernatant byl přenesen do nové zkumavky. Ke vzorku bylo následně přidáno 100 μ l 3M Na-acetátu o pH 5,2 (Sigma-Aldrich), 630 μ l fenolu (Sigma-Aldrich) a 270 μ l chloroformu (Sigma-Aldrich). Poté byly vzorky 15 minut chlazeny na ledu a následně centrifugovány 20 minut při 4°C a 14 000 rpm. Vodná fáze byla po centrifugaci přenesena do nové zkumavky. Po přidání 1 ml isopropanolu byly vzorky inkubovány přes noc při -20°C. Následující den byly po centrifugaci 20 minut při 4°C a 14 000 rpm pelety dvakrát promyty 75% etanolem a rozpuštěny v 10 μ l vody prosté RNáz.

3. Klasická GFCH metoda, jak je uvedena v bodu 2, RNA byla ale rozpuštěna v 10 μ l TE pufru (44).

4. GFCH metoda s rozpuštěním vzorků v TE pufru (viz bod 3) a zahřátím vzorků na 70°C po dobu 60 minut.

3.1.2. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla testována na čerstvých leukocytech periferní krve. Bylo porovnáno několik reverzních transkriptáz různých výrobců. RNA byla izolována GFCH metodou pro čerstvý materiál: Od 40 dobrovolníků bylo získáno po 20 ml krve. Leukocyty byly izolovány pomocí RBC pufru (0,15M chlorid amonný, 10mM bikarbonát draselný, 0,1mM Na₂EDTA) a lyzovány v 500 μ l denaturačního roztoku (viz výše). Poté bylo přidáno 50 μ l 2M natriumacetátu (pH 4,1), 450 μ l fenolu a 130 μ l směsi chloroform:isoamylalkohol (49:1). Po promíchání na vortexu byly vzorky 15 minut inkubovány na ledu a poté 15 minut centrifugovány při 4°C a 14 000 rpm. Vodná fáze roztoku byla přenesena do nové zkumavky a po přidání 500 μ l isopropanolu následovala noční inkubace při -20°C. Poté byly vzorky stočeny 15 minut při 4°C a 14 000 rpm, peleta byla dvakrát promyta v 75% etanolu, sušena na

vzduchu při pokojové teplotě (PT) a rozpouštěna ve 20-50 μ l vody pro RNA 10 minut při 55°C a dále 20 minut při PT. RNA byla poté uchována při -80°C.

3.1.3. Kontrola kvality RNA

Kontrola kvality RNA izolované z čerstvých leukocytů byla provedena standardně elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Do dalšího zpracování byly zařazeny pouze vzorky s jasným signálem pruhů pro rRNA 18S a 28S po barvení v ethidiumbromidu. Vzorky byly dále po šedesátinásobném ředění vodou pro injekce podrobeny spektrofotometrické analýze, byla měřena absorbance vzorků při vlnových délkách 260 a 280 nm. Ze získaných hodnot byl spočítán poměr 260/280, udávající kvalitu izolované RNA, a dále koncentrace vzorku. Kontrola kvality RNA izolované z FFPE byla prováděna spektrofotometricky stejným způsobem. Pro analýzu spektrofotometrických hodnot RNA z FFPE materiálu bylo použito 44 FFPE vzorků, které byly získány celkem z 25 parafinových bloků. Některé bloky byly použity opakovaně pro více vzorků, které byly izolovány různě účinnými metodami, což umožnilo i analýzu vzorků s velmi nízkým obsahem RNA.

3.1.4. Reverzní transkripce (RT) a kvalitativní PCR

Reverzní transkripce byla optimalizována za použití RNA z čerstvých leukocytů. Byly porovnány tři RT kity od různých dodavatelů: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), Transkriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) a M-MLV reverzní transkriptáza (Top-Bio). Ve všech případech bylo použito vstupní množství RNA 1 μ g a bylo postupováno dle protokolů doporučených výrobcem. Po RT byla provedena kvalitativní PCR pro geny β -2-mikroglobulin (*B2m*), hypoxantinfosforibosyltransferáza 1 (*Hprt1*) a TATA box binding protein (*Tbp*). Pro každý gen byly použity dva odlišné páry primerů, které byly původně navrženy pro dvoukrokovou PCR (program Primer3). Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Sekvence použitých primerů.

	Levý primer 5'-3'	Pravý primer 5'-3'	Amplikon
<i>B2m</i> LV-PV	gagtatgcctgccgtgtg	aatccaaatgcggcatct	110 bp
<i>B2m</i> LVn-PVn	ttgtcacagcccaagatagtt	cggcatcttcaaacctcca	70 bp
<i>Hprt1</i> LV-PV	tggtcaggcagtataatccaaa	ggaattcaaatccaacaaagt	106 bp
<i>Hprt1</i> LVn-PV	aagatggtaaggtcgcaag	ggaattcaaatccaacaaagt	86 bp
<i>Tbp</i> LV-PV	gttctgggaaaatggtgtgc	ggaaaaccaacttctgtacaac	97 bp
<i>Tbp</i> LV-PVn	gttctgggaaaatggtgtgc	catatttcttctgtgccagt	69 bp

Legenda: *B2m* - β -2-mikroglobulin, *Hprt1* - hypoxantinfosforibosyltransferáza 1, *Tbp* - TATA box binding protein. LV – levý vnější primer, PV – pravý vnější primer, LVn – levý vnitřní primer, PVn – pravý vnitřní primer, amplikon – délka amplikonu v párech bazí (bp).

Složení PCR reakční směsi o konečném objemu 30 μ l na vzorek: 1x pufr, 1,5 IU Taq polymerázy (Top-Bio), 200 nM dNTPs, po 500 nM levého a pravého primeru a 0,6 μ l cDNA templátu. Cyklační program byl následující: 94°C/5 min počáteční denaturace, dále 31 cyklů 94°C/45 s, 58°C/90 s a 72°C/90 s a následně finální extenze při 72°C/7 min.

Poznámky pro FFPE materiál

RT RNA získané z FFPE tkáně byla po optimalizaci metody (viz Výsledky I) prováděna kitem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit firmy Fermentas. Pro RT každého FFPE vzorku byl použit vstupně 1 μ g RNA. V případě, že se v izolaci nezdařilo toto množství získat, bylo použito veškeré izolované množství RNA, byl-li vzorek izolován některou z modifikací GFCH metody. V obdobném případě při izolaci kitem, kterým je izolována standardně RNA o objemu 40 μ l, bylo pro RT užito 11 μ l RNA, což je největší možný objem vstupního materiálu vzorku dle protokolu výrobce.

3.1.5. Gelová elektroforéza

Výsledky kvalitativní PCR byly vyhodnocovány pomocí vertikální gelové elektroforézy na 10% polyakrylamidových gelech s ethidiumbromidovou vizualizací pod UV zdrojem. Délka PCR produktů byla posuzována pomocí pUC18 x HaeIII markeru.

3.1.6. RTqPCR

Pro RTqPCR experimenty byly použity vzorky z celkem osmi parafinových bloků. Z každého bloku byl vždy jeden vzorek izolován kitem (Roche), čtyři z uvedených bloků byly rovněž použity k izolaci čtyř vzorků pomocí GFCH metody. U těchto vzorků byl předpoklad horší kvality RNA (viz Výsledky I). Celkem bylo tedy v RTqPCR analyzováno 12 vzorků získaných z osmi parafinových bloků. Byly testovány různé způsoby detekce fluorescence: SYBR green, TaqMan sonda navrhovaná v naší laboratoři (vlastní sonda) a TaqMan sonda navrhovaná a vyrobená firmou (Applied-Biosystems, komerční sonda). Detekce SYBR greenem a vlastní sondou byla vyšetřena u všech dvanácti vzorků, detekce vlastní a komerční sondou byla porovnávána pouze u osmi vzorků izolovaných komerčním kitem.

RTqPCR byla prováděna na přístroji firmy Stratagene –Stratagene 3000 Xp cykler.

1. Reakce s využitím SYBRgreenové detekce byly optimalizovány pro geny *B2m* a *Hprt1*, a to s použitím vnějších párů primerů, jak uvedeno v Tabulce 1. Reakce byly prováděny v dupletech či tripletech, reakční směs o finálním objemu 25 μ l měla následující složení: SYBR green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich), primery pro *B2m* v koncentraci 200 nM nebo primery pro *Hprt1* v koncentraci 100 nM a 500 ng cDNA templátu získaného z izolace RNA z FFPE tkáň. Cyklační program byl zahájen iniciální denurací při 95°C/2 min, následovalo 40 cyklů o třech krocích: denaturace 95°C/15 s, anelace 60°C/60 s a elongace 72°C/60 s. Na konci programu bylo provedeno měření křivky tání PCR produktu v rozsahu 58-95°C s jednotlivými teplotními kroky o 1°C. Reakční podmínky byly před experimenty s FFPE materiálem optimalizovány na RNA/cDNA získané z čerstvých leukocytů.

2. Jak uvedeno výše, v experimentech s detekcí pomocí fluorescenční sondy byly použity dva typy sekvencí – vlastní a komerční. Sekvence vlastních sond, navržených pomocí programu Primer3, jsou uvedeny v Tabulce 2. Pro jednotlivé geny byly použity vnější primery jak uvedeno v Tabulce 1. Vlastní sondy a primery byly vyrobeny firmou Sigma-Aldrich.

Tabulka 2. Sekvence vlastních Taqman sond.

<i>B2m</i>	5' FAM-tgctgcttacatgtctcgatcccact-BQ13'
<i>Hprt1</i>	5' FAM-atccaacacttcgtgggtcctttca -BQ13'

Reakční podmínky pro vlastní detekční sondu: Celkový objem reakce byl 25 μ l, reakce byly provedeny v dupletech či tripletech. Reakční směs obsahovala 1x pufr dodávaný k polymeráze, 0,6 IU Taq polymerázy (Top-Bio), 200 nM dNTPs, genově specifické primery ve finální koncentraci 600 nM, genově specifickou sondu v koncentraci 250 nM a 500 ng cDNA templátu. Cyklační program sestával z iniciální denaturace 95°C/5 min a 40 cyklů o dvou krocích: denaturace 95°C/15 s a anelace/elongace 60°C/60 s.

Použité komerční sondy jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3. Použití komerční sondy.

<i>B2m</i>	Hs 00187842-m1
<i>Hprt1</i>	Hs 99999909-m1
<i>Rplp0</i>	Hs 99999902-m1

Finální objem reakcí u komerčních sond byl 20 μ l, reakce byly provedeny v triplicátech s použitím 10 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix, 1 μ l směsi fluorescenční sondy a příslušných primerů a 500 ng cDNA templátu. Cyklační program sestával z iniciálního kroku 95°C/10 min (denaturace nukleové kyseliny + uvolnění protilátky blokuující aktivitu polymerázy), následovalo 40 cyklů o dvou krocích: denaturace 95°C/15 s a anelace/elongace 60°C/60 s.

3.1.7. Kontrolní skupina – validační set

Po analýze výsledků uvedených kroků (izolace RNA, kontrola její kvality, reverzní transkripce a RTqPCR) byl sestaven konečný protokol doporučený pro izolaci RNA a analýzu genové exprese z FFPE tkáně (viz Výsledky I). Tento protokol byl ověřen na 65 FFPE vzorcích DLBCL a PMBL, a to na genech *B2m* a *Rplp0* (Ribosomal protein P0, housekeepingový gen) pomocí sond uvedených v Tabulce 3.

3.1.8. Statistika

Pro srovnání kvality izolačních metod bylo pracováno s geometrickým průměrem Ct hodnot *B2m* genu, a to vždy souhrnně pro všechny vzorky izolované stejnou metodou. Byl použit Duncanův post hoc test mnohonásobného srovnávání. Pro predikci kvality PCR na základě změřených spektrofotometrických hodnot RNA byl použit model logistické regrese. Nejnižší množství izolované RNA, u kterého lze ještě očekávat přínosnou PCR reakci, bylo stanoveno pomocí lineární diskriminační analýzy. Výsledky získané s využitím vlastní a komerční sondy byly srovnány pomocí analýzy rozptylů (ANOVA). Variabilita v rámci jednoho experimentu (0,7%) a mezi jednotlivými RTqPCR reakcemi (5%) byla spočítána pomocí koeficientu variability.

3.2. Metody II

Ve stati Metody II je popsána metodika, která byla použita při sledování vlivu nescifického genového pozadí vzorků na výsledek měření genové exprese sledovaných genů. Analýza byla provedena na molekule CD10. Celkem bylo testováno 69 vzorků.

3.2.1. RTqPCR

Pro analýzu genové exprese z FFPE tkáně byl použit protokol uvedený ve stati Výsledky I.

3.2.2. Imunohistochemie

Imunohistochemické barvení *CD10* (Novocastra, ředění 1:80) bylo provedeno podle standardního protokolu pro barvení parafinových řezů. Byla použita metoda revitalizace antigenů teplem (heat induced epitope retrieval).

V každém vzorku bylo spočítáno procento *CD10* pozitivních buněk jak v nádorové tkáni preparátu, tak v nenádorovém pozadí - stromatu. Hranice positivity byla dle obecných histopatologických doporučení stanovena na 10%. Podle různých kombinací positivity a negativity tumoru a stromatu byly vzorky finálně rozděleny do čtyř imunohistochemicky definovaných skupin (viz dále).

3.2.3. Statistika

Porovnání genové exprese *CD10* mezi jednotlivými imunohistochemickými skupinami bylo provedeno pomocí Mann-Whitney testu.

3.3. Metody III

Tato stať se týká metod a postupů použitých při analýze genové exprese PMBL a DLBCL.

3.3.1. Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 82 pacientů s histologicky prokázanou diagnózou DLBCL. Diagnóza byla u všech případů revidována a potvrzena dvěma nezávislými expertními hematopatologi (MUDr. Campr, Ústav patologie a molekulární medicíny Motol, MUDr. Střítecký, Ústav patologie VFN). Ke stanovení klinicko-patologické diagnózy PMBL byla použita stejná kritéria jako v práci (11), tedy DLBCL histologie a mediastinální lymfadenopatie, v našem případě větší než 7 cm aspoň v jednom rozměru (citovaná práce uvažovala hranici bulky postižení 6cm). Tímto způsobem byla diagnóza PMBL stanovena u 39/82 pacientů. Tito pacienti byli označeni jako pacienti s očekávanou PMBL diagnózou, zkráceně očekávané PMBL (oPMBL) a všichni byli diagnostikováni de novo. Ostatních 43 pacientů bylo zařazeno do skupiny s očekávanou DLBCL diagnózou (oDLBCL). V této skupině bylo osm vzorků pacientů, které byly získány až v době progresu choroby a tito pacienti byli vyloučeni z analýzy přežití. Pacienti byli léčeni chemoterapeutickými režimy obsahujícími antracykliny. U dvou pacientů v souboru nebyla terapie vzhledem k věku a stavu zahájena vůbec. 72/82 pacientů bylo léčeno v kombinaci s anti CD20 protilátkou (rituximab).

3.3.2. Výběr vyšetřovaných genů

K výběru genů byla použita publikovaná data získaná vyšetřením genových čipů. Lidský diferenciální leukocytární antigen (*Fcer2/CD23*) je klíčovou molekulou v aktivaci a růstu B-buněk a je patologicky zvýšeně exprimován v PMBL buňkách (15). Programmed cell death 1 ligand 2 (*Pdl2*) se účastní regulace T-buněčné aktivity a je rovněž patologicky zvýšeně exprimován v PMBL (15). B-lymfoidní tyrosinkináza (*Blk*) je součástí signální kaskády BCR receptoru a v PMBL je její exprese ve srovnání s DLBCL snížena (11).

3.3.3. Isolace RNA a RTqPCR metoda

V této části práce byla použita výsledná metoda izolace RNA a RTqPCR analýzy tak, jak je popsána ve stati Výsledky I. Relativní kvantifikace byla provedena za použití housekeepingových genů *B2m* a *Rplp0* (viz Metody I). Komerční sondy a primery pro geny *Fcer2/CD23* (Hs 00233627_m1), *Pdl2* (Hs 00228839_m1) a *Blk* (Hs 01017457_m1) byly pořízeny u firmy Applied Biosystems. Délka všech použitých ampliconů byla v rozmezí 60 – 105 bp.

3.3.4. Testovací a validační set

Celkem 32 pacientů, tedy 11 pacientů s oPMBL a 21 pacientů s oDLBCL, bylo zařazeno do tzv. testovacího setu. Abychom minimalizovali riziko, že do testovacího setu budou zařazeni i oPMBL pacienti, kteří sice splňují klinicko-patologická kritéria pro tuto diagnózu, ale nesou genovou expresi typickou pro DLBCL, byly v testovacím setu použity pouze vzorky oPMBL pacientů, kteří neměli žádné extrathorakální postižení. V tzv. validačním setu bylo 50 pacientů, z nich 28 s oPMBL.

Nejprve byla v testovacím setu vyšetřena exprese genů *Fcer2*, *Pdl2* a *Blk*. Získaná data byla použita k vygenerování tzv. diskriminační funkce. Jde o statistickou metodu, která vyhodnotí rozdíl exprese každého jednotlivého genu ve skupině oPMBL i oDLBCL a poté mu přiřadí konstantu, která popisuje míru diskriminační schopnosti tohoto genu mezi jednotlivými skupinami diagnóz. Pomocí takto získaných konstant je sestavena diskriminační rovnice, která je po dosazení expresních hodnot vyšetřovaných genů schopna predikovat, zda nově vyšetřený vzorek odpovídá svou genovou expresí spíše diagnóze PMBL nebo DLBCL. Při generování diskriminační funkce bylo pracováno s mediány hodnot exprese jednotlivých genů získaných pomocí $\Delta \Delta C_T$ metody.

3.3.5. Imunohistochemie

Imunohistochemické barvení bylo provedeno na parafinových tkáňových řezech za použití standardních metod. U všech protilátek byla použita metoda revitalizace antigenů

teplem, u BCL6 v roztoku o vysokém pH. Panel protilátek a příslušná ředění jsou uvedeny v Tabulce 4.

Všechny vzorky včetně oPMBL byly vyšetřeny a zařazeny pomocí algoritmu Hansové (viz výše) do podskupin GC-like a nonGC-like DLBCL.

Tabulka 4: Seznam použitých imunohistochemických protilátek, jejich výrobců a ředění

Protilátka (výrobce)	Ředění
<i>CD20</i> (DAKO)	1:300
<i>CD30</i> (DAKO)	1:30
<i>CD5</i> (Biogenex)	1:30
<i>CD23</i> (Neomarkers)	1:100
<i>CD10</i> (Novocastra)	1:80
<i>Bcl6</i> (DAKO)	1:15
<i>Mum1</i> (DAKO)	1:100

3.3.6. Statistika

Genová exprese v PMBL a DLBCL skupinách, asociace genové exprese s orgánovým postižením a věkové srovnání v jednotlivých skupinách byly analyzovány Wilcoxonovým testem. Diskriminační rovnice byla generována pomocí kanonické diskriminační funkce. Přežití bez progresse (Progression free survival, PFS) bylo analyzováno pomocí Kaplan-Meierových křivek a log-rank testu. Orgánové postižení mezi skupinami PMBL a DLBCL bylo srovnáno pomocí kontingenčních tabulek. Stupeň iniciálního postižení a mezinárodní prognostický index (IPI) mezi skupinami DLBCL a PMBL byly srovnány Kruskal-Wallisovým testem. Statistika byla spočítána s pomocí programu SPSS.

4. VÝSLEDKY

4.1. Výsledky I

4.1.1. RNA izolace z FFPE tkáně

Celkem osm vzorků bylo izolováno paralelně všemi čtyřmi izolačními metodami. Jednotlivé izolační protokoly byly porovnávány pomocí Ct hodnot genu *B2m* v jednotlivých vzorcích. Ct hodnoty byly snímány na počátku exponenciální fáze reakce. V analýze byla použita vlastní Taqman sonda. U všech vzorků byla použita stejná reverzní transkriptáza. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5. Izolace komerčním kitem dává s geometrickým průměrem Ct 29,88 v konečné RTqPCR signifikantně lepší výsledky než ostatní izolační metody ($p < 0,001$). Vzorky izolované ostatními třemi metodami dosáhly exponenciální fáze přibližně o pět cyklů později. Jednotlivé varianty GFCH metody se naproti tomu od sebe signifikantně neliší. I ostatní parametry kvality RTqPCR, tj. strmost křivky a homogenost dupletů byly lepší po izolaci komerčním kitem (Obr. 3).

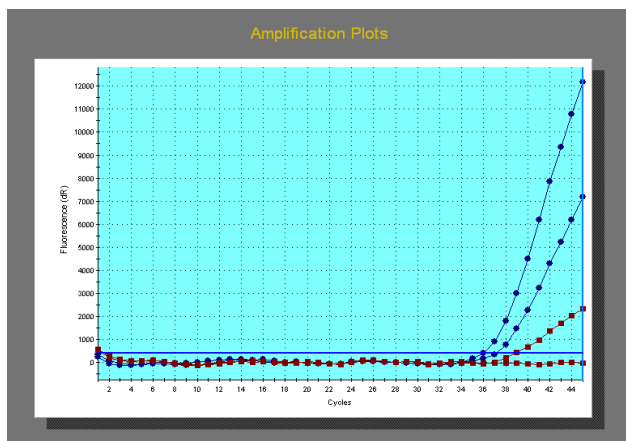
Tabulka 5. Srovnání izolace RNA komerčním kitem a různými variacemi GFCH metody pomocí Ct hodnot *B2m* genu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	X _g	95%CI
Kit	26,34	34,60	28,32	27,03	27,54	31,56	32,88	31,90	29,88	27,43- 32,55
GFCH/voda	32,11	-	32,91	35,53	35,97	39,66	33,70	33,59	34,70	32,49- 37,07
GFCH/TE	33,62	39,24	36,63	36,98	36,00	37,43	33,68	33,15	35,78	34,02- 37,64
GFCH/zTE	34,28	39,49	36,97	36,48	35,35	38,72	34,04	33,72	36,07	34,32- 37,92

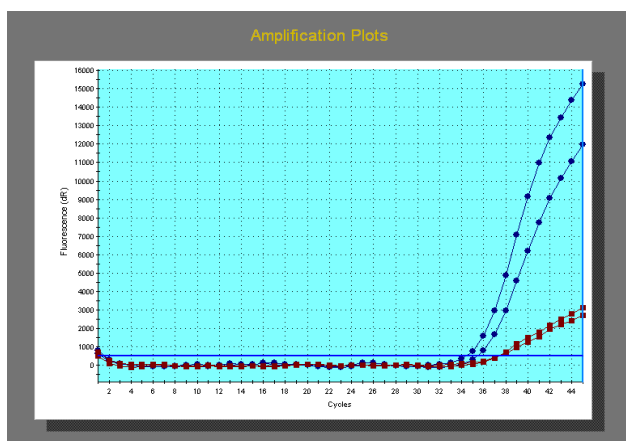
Legenda: Levý sloupec – jednotlivé izolační protokoly ve shodném pořadí, jak bylo uvedeno v metodách I. Horní řádek – číslo vzorku. GFCH – guanidin-fenol-chloroformová metoda, TE – TE pufr, zTE – zahřátý TE pufr, X_g – geometrický průměr Ct hodnot v příslušném řádku, 95% CI – 95% interval spolehlivosti.

Obr. 3. Srovnání metod izolace RNA z FFPE tkáně. Vzorky 3A až 3D jsou získané z totožného parafinového bloku. Ve všech analýzách byla užita vlastní Taqman sonda.

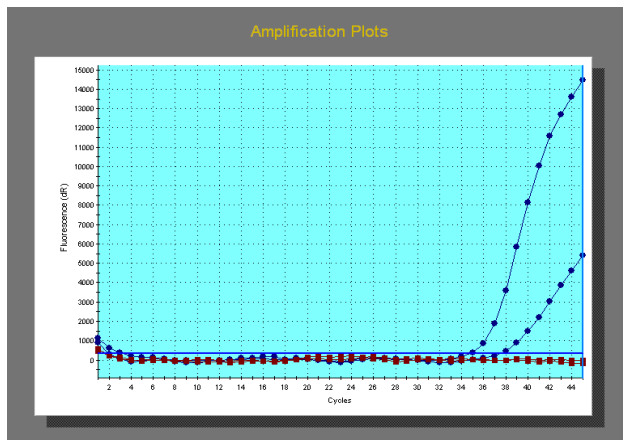
3A. Izolace GFCH metodou, vzorky rozpuštěné ve vodě. Modrá křivka – *B2m*, červená křivka – *Hprt1*.



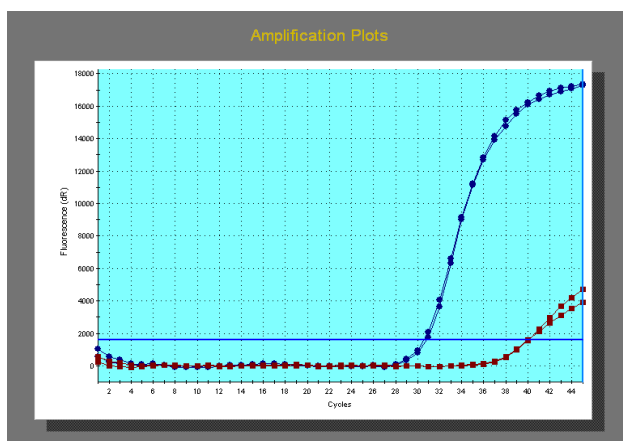
3B. Izolace GFCH metodou, vzorky rozpuštěné v TE pufru. Barevné označení genů viz 3A.



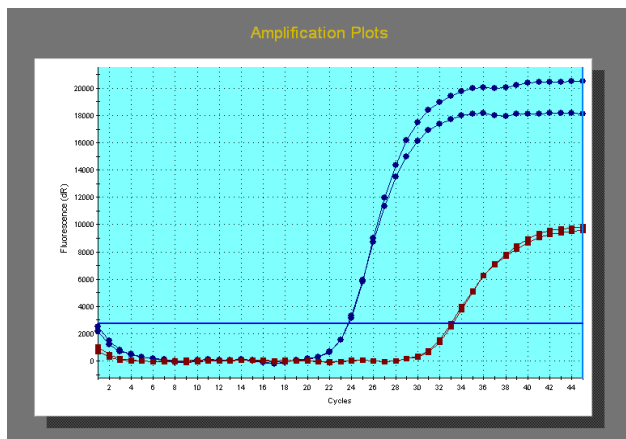
3C. Izolace GFCH metodou, vzorky rozpuštěné v TE pufru a zahřáté. Barevné označení genů viz 3A.



3D. Izolace komerčním kitem. Barevné označení genů viz 3A.



3E. Vyšetření RNA izolované z čerstvých lymfocytů. Barevné označení genů viz 3A.



4.1.2. Spektrofotometrická analýza RNA

Analýza byla provedena na 44 vzorcích z FFPE materiálu. V šedesátinásobném ředění vzorků byla absorbance při 260 nm v rozmezí 0,013-0,333 a množství izolované RNA v rozmezí 0,3-32 µg na vzorek.

Jako možné prediktory kvality PCR reakce byly testovány parametry: absorbance vzorku při vlnové délce 260 nm, při vlnové délce 280 nm, koncentrace izolované RNA a množství izolované RNA. Z uvedených parametrů mělo pouze množství izolované RNA ze vzorku výpovědní hodnotu z hlediska predikce kvality PCR ($p=0,003$). Hraniční množství izolované RNA, kdy je ještě možno předpokládat přijatelný průběh PCR, je 5700 ng na vzorek. Poměr 260/280 pro RNA z FFPE tkáně byl průměrně 1,5 (1,49 pro vzorky dobře reagující v PCR versus 1,52 pro vzorky reagující špatně či vůbec; $p=0,76$).

4.1.3. Reverzní transkripce a kvalitativní PCR

Porovnávali jsme kvalitu reverzních transkriptáz od tří výrobců. Abychom vyloučili chybu vzniklou horší kvalitou RNA z FFPE vzorků, byla v tomto kroku použita RNA izolovaná z čerstvých leukocytů. Výsledky vyšetření tří genů v pěti RNA/cDNA vzorcích jsou uvedeny v Tabulce 6. RevertAid transkriptáza (Fermentas) úspěšně přepsala RNA do cDNA v 11/12 provedených reakcích (92%), Transcriptor (Roche) ve 12/12 reakcích (100%) a TopBio MMLV transkriptáza v 11/15 reakcích (73%). Vzorky, které nebyly detekovány pomocí PCR po RT TopBio MMLV transkriptázou, byly úspěšně přepsány minimálně jedním ze zbývajících dvou enzymů.

Tabulka 6. Reverzní transkripce v čerstvých leukocytech

RT	Vzorek	<i>B2m</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Tbp</i>
RevertAid/Fermentas	1	+	+	+
	2	NA	NA	NA
	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	-	+
Transcriptor/Roche	1	NA	NA	NA
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
MMLV/TopBio	1	+	-	-
	2	+	-	+
	3	+	+	+
	4	+	-	+
	5	+	+	+

Legenda: Levý sloupec – užitá reverzní transkriptáza, *B2m* - β -2-mikroglobulin, *Hprt1* - hypoxantinfosforibosyltransferáza 1, *Tbp* - TATA box binding protein, „+“ znamená detekci genu, „-“, gen nebyl detekován, „NA“ – vzorek nebyl vyšetřen.

4.1.4. Porovnání detekce fluorescence pomocí SYBR green a vlastní Taqman sondy

Detekce byla porovnána celkem ve dvanácti FFPE vzorcích, které byly získány z osmi parafrinových bloků. Ze všech osmi bloků bylo použito po jednom vzorku izolovaném kitem, ze čtyř bloků k tomu ještě vzorky izolované GFCH metodou. Tyto posledně zmíněné vzorky byly zařazeny záměrně pro očekávanou nižší kvalitu RNA. Reakční podmínky RTqPCR byly nejprve optimalizovány na RNA získané z čerstvých leukocytů, vyšetřována byla exprese genů *B2m* a *Hprt1*. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7. Pomocí Taqman sondy jsme detekovali současně oba dva geny v šesti vzorcích (6/12), s pomocí SYBR greenu pouze ve dvou (2/12). Rozdíl čtyř vzorků, které byly vyšetřitelné Taqman sondou, ale nikoli SYBR greenem, byl dán vznikem dimerů primerů v barvení SYBR green. V šesti vzorcích jsme detekovali pouze *B2m* nebo žádný gen, a to bez ohledu na použitou metodu detekce.

Delta Ct hodnoty rozdílu exprese *B2m* a *Hprt1* v jednotlivých vzorcích byly srovnatelné v FFPE tkáni a čerstvých leukocytech.

Tabulka 7. SYBR green versus Taqman sonda v FFPE vzorcích

	1/K	1/G	2/K	2/G	3/K	3/G	4/K	4/G	5/K	6/K	7/K	8/K
<i>B2m</i> SYBR	+	D	D	-	D	D	+	D	D	D	D	D
<i>Hprt1</i> SYBR	+	D	D	-	-	-	+	-	D	D	-	-
<i>B2m</i> sonda	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hprt1</i> sonda	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-

Legenda: Levý sloupec – gen a způsob detekce, horní řádek – číslo vzorku/izolační metoda, “K” –kit, “G” – GFCH metoda, “+” – detekce genu, “-“ – gen nebyl detekován, “D” – gen byl detekován s dimery primerů na pozadí.

4.1.5. Porovnání vlastní a komerční Taqman sondy při vyšetření FFPE tkáně

Delta Ct hodnoty rozdílu (*Hprt1-B2m*) byly vyhodnoceny v osmi vzorcích, které byly paralelně vyšetřeny oběma druhy sond. Vyšetření bylo limitováno detekcí genu *Hprt1*, který je málo exprimovaný. Úspěšně byl detekován ve čtyřech z osmi vzorků pomocí vlastní sondy a v šesti z osmi vzorků pomocí sondy komerční. V obou dvou vzorcích, kde byla detekce *Hprt1* prokázána pouze s použitím komerční sondy, byl gen zachycen na hranici detekability. Detekce oběma druhy sond dávala shodné hodnoty delta Ct v paralelních vzorcích.

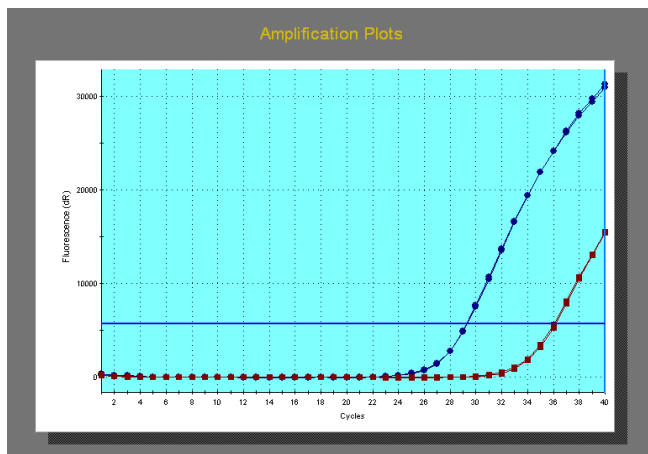
4.1.6. Sestavení konečného protokolu a jeho ověření

Po zhodnocení průběžných výsledků efektivity jednotlivých kroků byly vybrány nejúspěšnější z nich a byl sestaven výsledný protokol pro izolaci a analýzu RNA a genové exprese z parafinizované tkáně:

1. izolace RNA pomocí komerčního kitu (Roche),
2. spektrofotometrické měření vzorku,
3. reverzní transkripce RevertAid reverzní transkriptázou (Fermentas),
4. RTqPCR a fluorescenční detekce Taqman sondou.

V další fázi byla sledována detekce housekeepingových genů *B2m* a *Rplp0* ve validačním setu. Úspěšnost vyšetření byla 95% (62/65 FFPE vzorků) (Obr. 4). Ve validačním setu byla rovněž provedena podrobná analýza spektrofotometrických parametrů. Medián výtěžku izolované RNA byl 11100 ng na vzorek (rozmezí 2200-48480 ng). 51/65 vzorků (78%) překročilo původně danou hranici minimálního množství izolované RNA pro úspěšnou PCR, tj. 5700 ng. Všechny tyto vzorky reagovaly dobře v RTqPCR. 14/65 vzorků (22%) bylo pod touto hranicí, dva z nich v RTqPCR nereagovaly a jeden nebyl vůbec testován pro velmi nízké spektrofotometrické hodnoty. 11/14 vzorků s podlimitním izolačním výtěžkem reagovalo dobře, ačkoli průměrná Ct hodnota pro *B2m* byla o 1,27 cyklu vyšší než u vzorků, ze kterých bylo izolováno více než 5700 ng RNA (*B2m* Ct 26,6 pro kvalitnější vzorky versus Ct 27,86 pro vzorky méně kvalitní, $p=0,086$).

Obr. 4. Detekce housekeepingových genů *B2m* a *Rplp0* ve validačním setu.



4.2. Výsledky II

Stat' výsledky II se zabývá analýzou vlivu exprese genů nenádorového stromatu na výsledky exprese v nádorových buňkách.

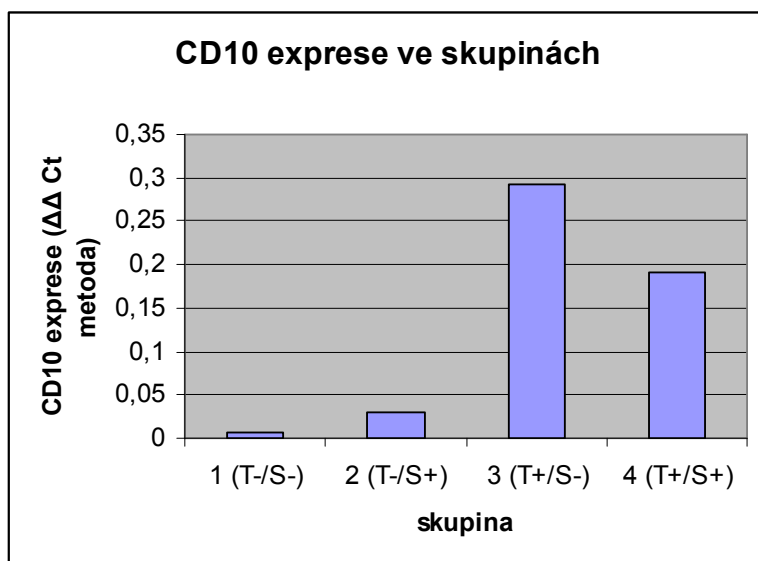
Podle imunohistochemického barvení *CD10* byly vzorky rozděleny dle kombinace pozitivitu a negativitu nádorových a stromálních buněk na čtyři skupiny, viz Tabulka 8. Genová exprese v jednotlivých imunohistochemických skupinách zjištěná pomocí RTqPCR je vynesena v grafu – Obr. 5.

Tabulka 8. Rozdělení vzorků podle *CD10* pozitivitu.

Skupina	tumor	stroma	Počet vzorků	$\Delta \Delta C_T$ medián
1 (T-/S-)	-	-	40	0,006
2 (T-/S+)	-	+	9	0,03
3 (T+/S-)	+	-	11	0,293
4 (T+/S+)	+	+	9	0,19

Legenda: „T“ odpovídá tumorózním buňkám, „S“ buňkám stromálním, „+“ jsou IHC pozitivní případy, „-“, případy IHC negativní.

Obr. 5. *CD10* exprese v jednotlivých imunohistochemických skupinách.



CD10 pozitivní a negativní nádory (tzn. nádory s pozitivními a negativními nádorovými buňkami) se od sebe navzájem v expresi *CD10* genu signifikantně lišily ($p < 0,001$), a to bez ohledu na to, zda jejich nenádorové stroma bylo *CD10* pozitivní či *CD10* negativní.

V Tabulce 9 jsou uvedeny p-hodnoty srovnávající jednotlivé IHC skupiny navzájem. Skupina 1 a 2 se od sebe v expresi genu *CD10* na úrovni mRNA významně neliší. To znamená, že pozitivita stromálních buněk významně nezvýšila zjištěnou *CD10* expresi u *CD10* negativního tumoru ($p=0,096$). Důležité bylo srovnání skupin 2 a 3. Tyto skupiny se navzájem v expresi *CD10* mRNA významně liší ($p=0,012$). To znamená, že *CD10* pozitivní stroma u *CD10* negativního tumoru nezvýší expresi *CD10* mRNA na tak velikou úroveň, jakou vykazují nádory *CD10* pozitivní. *CD10* pozitivní tumory vykazovaly přibližně stejnou expresi mRNA *CD10*, a to bez ohledu na pozitivitu či negativitu stromálních buněk pozadí ($p=0,820$).

Tabulka 9. P-hodnoty srovnávající expresi *CD10* mRNA mezi jednotlivými IHC skupinami.

	1 (T-/S-)	2 (T-/S+)	3 (T+/S-)	4 (T+/S+)
1 (T-/S-)	NA	0,096	<0,001*	<0,001*
2 (T-/S+)	0,096	NA	0,012*	<0,001*
3 (T+/S-)	<0,001*	0,012*	NA	0,820
4 (T+/S+)	<0,001*	<0,001*	0,820	NA

Legenda: Použité zkratky odpovídají Tabulce 9. Statisticky signifikantní data jsou uvedena s hvězdičkou.

4.3. Výsledky III

Ve stati výsledky III jsou shrnuty výsledky analýzy genové exprese v DLBCL a PMBL lymfomech.

4.3.1. Genová exprese v testovacím setu a predikční rovnice

Podle očekávání byla ve skupině PMBL ve srovnání s DLBCL vyšší exprese genů *Fcer2* ($p=0,002$) a *Pdl2* ($p=0,002$), *Blk* byla více exprimována ve skupině DLBCL ($p=0,042$). Uvedené expresní výsledky byly použity k vygenerování predikční rovnice pomocí diskriminační funkce. Výsledná rovnice má následující tvar:

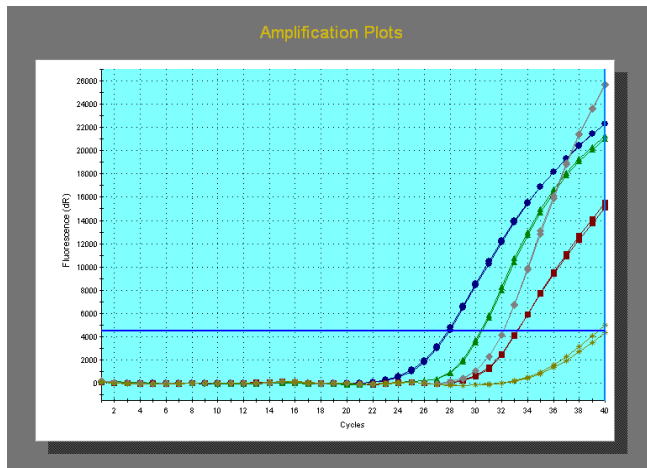
$$F = + 0,029 * Fcer2 + 0,006 * Pdl2 - 0,012 * Blk - 0,168.$$

Pomocí této rovnice byl následně analyzován celý soubor pacientů (viz dále). Byla-li výsledná hodnota výpočtu záporná, byl příslušný vzorek zařazen do skupiny označené jako „predikovaný DLBCL“ (pDLBCL). V případě matematicky kladného výsledku byl vzorek označen jako „predikovaný PMBL“ (pPMBL).

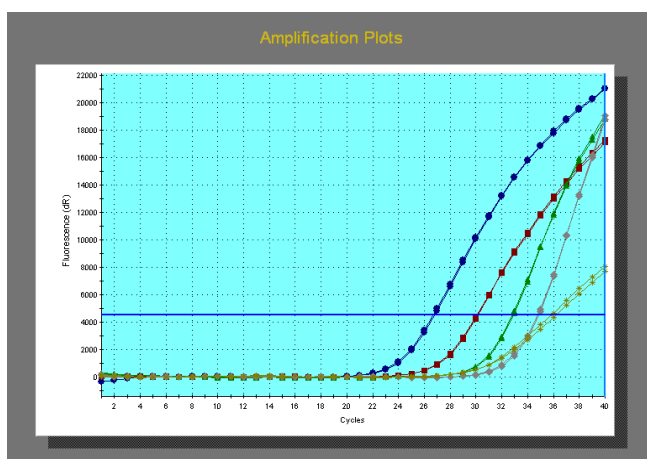
Z celkového počtu 32 pacientů v testovacím setu byly tři případy neshody genetické predikce s původně klinicko-patologicky očekávanou diagnózou. Ve dvou případech byly původně očekávané DLBCL případy klasifikovány geneticky jako pPMBL, třetí případ byl původně očekávaný PMBL, geneticky však predikovaný DLBCL. Typické průběhy RTqPCR křivek v jednotlivých predikovaných skupinách jsou na Obr. 6.

Obr. 6. Srovnání typických průběhů RTqPCR křivek v predikované PMBL a DLBCL skupině.

6A. Typický pacient predikovaný do skupiny PMBL. Křivky: modrá - *B2m*, zelená - *CD23/Fcer2*, šedá - *Pdl2*, červená - *Rplp0*, žlutá - *Blk*. *Fcer2* a *Pdl2* geny jsou exprimovány více než *Rplp0* housekeeping gen, křivka *Blk* genu stoupá až na konci RTqPCR experimentu.



6B. Typický pacient predikovaný do skupiny DLBCL. Zleva: *B2m*, *Rplp0*, *Fcer2*, *Pdl2*, *Blk*, barevné označení křivek viz 6A. Křivky *Fcer2* a *Pdl2* genů stoupají opožděně proti oběma housekeepingovým genům a interval mezi *Blk* a ostatními sledovanými geny je zkrácen.



4.3.2. Validační set

Ve validačním setu bylo analyzováno 50 případů, 28 z nich byly očekávané PMBL případy. Z těchto 28 vzorků bylo 9 geneticky predikováno jako DLBCL. Naopak, všech 22 pacientů ze skupiny oDLBCL bylo geneticky potvrzeno jako DLBCL (pDLBCL).

4.3.3. Analýza genové exprese v celém souboru

Celý soubor 82 pacientů byl analyzován pomocí predikční rovnice. Celkem 10 z původní skupiny 39 očekávaných PMBL (26%) bylo po genetické analýze vyhodnoceno jako predikované DLBCL. Podobně, s původně očekávanou diagnózou DLBCL byly geneticky v diskrepanci 2 z původních 43 vzorků (5%) (Tabulka 10).

Tabulka 10: Pacienti rozdělení podle očekávané a predikované diagnózy.

	pPMBL	pDLBCL	celkem
oPMBL	29	10	39
oDLBCL	2	41	43
celkem	31	51	82

Pacienti, u kterých se očekávaná klinicko-patologická a geneticky predikovaná diagnóza shodly, byli označeni jako konkordantní pacienti. Pacienti, u kterých mezi očekávanou a predikovanou diagnózou shoda nebyla, byli označeni jako pacienti diskordantní. Přehled diskordantních pacientů v testovacím a validačním setu je uveden v Tabulce 11.

Tabulka 11. Diskordantní pacienti v testovacím a validačním setu.

	Diskordantní PMBL	Diskordantní DLBCL
Testovací set (%)	9	10
Validační set (%)	32	0
Celkem (%)	26	5

Exprese *Fcer2* byla pozitivně asociována s nádorovou sklerózou ($p=0,005$) a bulky postižením ($p<0,001$), negativně s podbráničním postižením ($p=0,009$). Exprese *Pdl2* genu byla v pozitivní asociaci s nádorovou sklerózou ($p=0,001$) a bulky postižením ($p<0,001$). Exprese ani jednoho genu nebyla asociována s postižením plic, pleury a plic.

4.3.4. Analýza klinických charakteristik souboru

Klinická data byla analyzována odděleně ve skupinách očekávaných a predikovaných diagnóz. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 12.

Tabulka 12. Srovnání klinických charakteristik PMBL a DLBCL pacientů v očekávané a predikované skupině diagnóz.

	Očekávaná diagnóza			Predikovaná diagnóza		
	PMBL (n=39)	DLBCL (n=43)	p hodnota	PMBL (n=31)	DLBCL (n=51)	p hodnota
Medián věku (roky)	33	60	$p^* < 0,001$	30	59	$p^* < 0,001$
Ženy (%)	74	51	$p^* = 0,031$	77	53	$p^* = 0,027$
Podbrániční postiž. (%)	33	67	$p^* = 0,004$	30	65	$p^* = 0,002$
Plíce (%)	18	7	$p = 0,184$	19	8	$p = 0,131$
Slezina (%)	15	19	$p = 0,699$	6	24	$p = 0,068$
Pleura (%)	10	2	$p = 0,19$	13	2	$p = 0,068$
Perikard (%)	23	0	$p^* = 0,001$	29	0	$p^* < 0,001$
Fluidothorax (%)	51	10	$p^* < 0,001$	52	16	$p^* = 0,001$
Hrudní stěna (%)	10	0	$p^* = 0,049$	10	2	$p = 0,154$
VCSSy (%)	28	0	$p^* < 0,001$	30	4	$p^* = 0,002$
Elevace LDH (%)	92	61	$p^* = 0,001$	94	65	$p^* = 0,003$
Kostní dřeň (%)	0	18	$p^* = 0,031$	0	15	$p = 0,078$
Nádorová skleróza (%)	77	33	$p^* < 0,001$	81	37	$p^* < 0,001$

Legenda: Statisticky signifikantní data jsou označena hvězdičkou. (n) značí počet pacientů v jednotlivých skupinách, VCSSy značí syndrom vena cava superior. Následující data nebyla dostupná: vstupní hladina LDH u tří pacientů, výsledek vyšetření kostní dřene u šesti pacientů a postižení plic, pleury, perikardu, přítomnost fluidothoraxu a infiltrace hrudní stěny u jednoho pacienta.

Jak v očekávané, tak v predikované PMBL skupině byl věkový medián nižší než u DLBCL a postiženy byly především ženy. Podbrániční postižení bylo signifikantně častější v obou DLBCL skupinách. PMBL pacienti obou skupin měli vstupně signifikantně častější elevaci LDH, infiltraci perikardu, fluidothorax a častější nádorovou sklerózu. Žádný z nich neměl v době diagnózy postižení kostní dřev, a to jak v očekávané, tak v predikované skupině.

V celém souboru mělo celkem 11 pacientů syndrom horní duté žíly. Vzhledem k bulky postižení mediastina byli všichni vstupně zařazeni do skupiny očekávaných PMBL, dva z nich ale nesli genovou expresi typickou pro DLBCL. Ani ve skupině očekávaných ani ve skupině predikovaných diagnóz nebyl mezi PMBL a DLBCL diagnózami prokázán žádný signifikantní rozdíl v pokročilosti onemocnění v době diagnózy (tzv. vstupní staging) ani v mezinárodním prognostickém indexu IPI. Určitý stupeň nádorové sklerózy byl zjištěn u 77% očekávaných a 81% predikovaných PMBL pacientů. U DLBCL případů byla skleróza zjištěna u 33% očekávaných a 37% predikovaných případů.

4.3.5. Diskordantní pacienti

U 26% očekávaných PMBL a 5% očekávaných DLBCL případů nebyla diagnóza geneticky potvrzena a pacienti byli označeni jako diskordantní. Srovnání klinických dat diskordantních a tzv. konkordantních pacientů – tedy těch, kde očekávaná diagnóza byla potvrzena geneticky – je uvedeno v Tabulce 13.

Tabulka 13. Srovnání klinických dat diskordantních PMBL s konkordantními PMBL a konkordantními DLBCL.

	Dis. PMBL versus kon. PMBL			Dis. PMBL versus kon. DLBCL		
	Dis. PMBL (n=10)	Kon. PMBL (n=29)	p hodnota	Dis. PMBL (n=10)	Kon. DLBCL (n=40)	p hodnota
Med.věku (roky)	46	30	$p^*=0,037$	46	60	$p=0,039^*$
Ženy (%)	60	79	$p=0,228$	60	50	$p=0,571$
Podbrániční postiž. (%)	50	28	$p=0,195$	50	70	$p=0,232$
Plíce (%)	20	17	$p=0,845$	20	5	$p=0,180$
Slezina (%)	40	7	$p^*=0,028$	40	20	$p=0,185$
Pleura (%)	0	14	$p=0,556$	0	3	$p=1,000$
Perikard (%)	0	32	$p^*=0,045$	0	0	NA
Fluidothorax (%)	40	62	$p=0,408$	40	10	$p^*=0,044$
Hrudní stěna (%)	1	10	$p=1,000$	1	0	$p=0,204$
VCSSy (%)	20	32	$p=0,504$	20	0	$p^*=0,037$
Elevace LDH (%)	67	100	$*p=0,01$	67	66	$p=0,96$
Kostní dřeň (%)	0	0	NA	0	18	$p=0,156$
Nádorová skleróza (%)	60	83	$p=0,141$	60	33	$p=0,109$

Legenda: Statisticky signifikantní data jsou označena hvězdičkou. Chybějící data jsou uvedena v legendě tabulky 13. Dis. je zkratka pro diskordantní, kon. pro konkordantní, Med. pro medián, VCSSy pro syndrom vena cava superior.

4.3.6. Diskordantní versus konkordantní PMBL pacienti

Celkem šest pacientů v celém 82členném souboru mělo současně mediastinální bulky postižení a infiltraci sleziny. Vzhledem k mediastinální mase byli všichni vstupně zařazeni do očekávané PMBL skupiny, čtyři z nich však po genové analýze spadali do diskordantních PMBL ($p=0,028$). Žádný diskordantní PMBL pacient neměl infiltraci perikardu ($p=0,045$).

Tři očekávaní PMBL pacienti neměli vstupně elevovanou LDH (pro PMBL je elevace LDH typická) a všichni tři spadali po genetické analýze do diskordantní skupiny ($p=0,01$). Ve srovnání s konkordantní PMBL skupinou byl v diskordantní vyšší věkový medián ($p=0,037$). Diskordantní PMBL pacienti měli dále sklon k častějšímu podbráničnímu postižení, měli méně často nádorovou sklerózu, méně často fluidothorax, syndrom horní duté žíly a infiltraci hrudní stěny. Nikdo z diskordantních PMBL pacientů neměl postiženu pleuru.

4.3.7. Diskordantní PMBL versus konkordantní DLBCL pacienti

Při srovnání těchto dvou skupin byli diskordantní PMBL pacienti mladší ($p=0,039$) a měli častěji fluidothorax ($p=0,004$) a syndrom horní duté žíly ($p=0,037$), tedy znaky související s přítomností nádorové masy v mediastinu. Žádné další klinické charakteristiky nebyly mezi těmito dvěma skupinami statisticky významně odlišné.

4.3.8. Diskordantní DLBCL pacienti

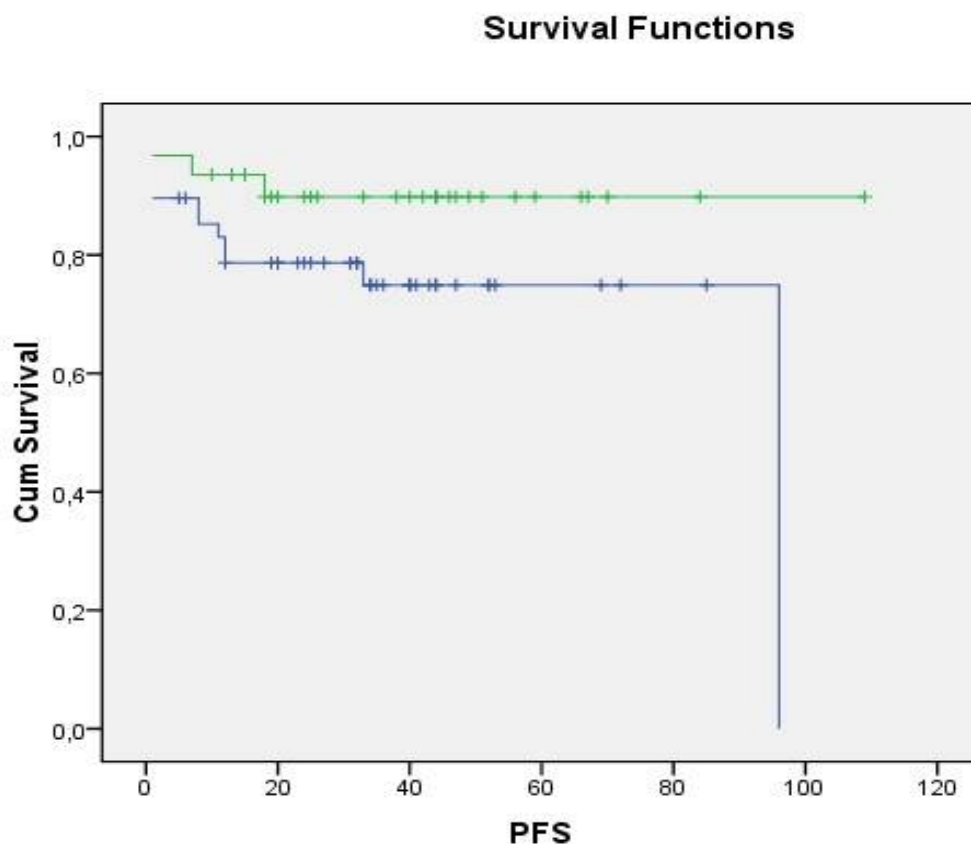
2/43 (5%) původně očekávaných DLBCL pacientů neslo genovou expresi typickou pro PMBL. Oba dva pacienti byli v době analýzy výsledků v první kompletní remisi, a to jeden 46 měsíců a druhý 40 měsíců po léčbě. Zajímavostí bylo, že oba dva uvedení pacienti měli nádorovou masu nad 7 cm v jiných anatomických lokalizacích. Jednou se jednalo o axilu, v druhém případě o retroperitoneum.

4.3.9. Analýza přežití

Doba přežití bez progresu (PFS) PMBL a DLBCL pacientů byla srovnávána jak ve skupině očekávaných, tak ve skupině predikovaných diagnóz. Podle předpokladů měli v obou skupinách tendenci k lepší prognóze pacienti s PMBL. Ve skupině očekávaných diagnóz

nebyl výsledek statisticky významný ($p=0,179$), ve skupině predikovaných diagnóz byl signifikantní na desetiprocentní hladině významnosti ($p=0,084$). Viz. Obr. 7.

Obr 7: Doba přežití bez progresu u predikovaných diagnóz. Zelená křivka – PMBL pacienti, modrá křivka – DLBCL pacienti, $p = 0,084$.



4.3.10. Imunohistochemická analýza nádorových vzorků

Výsledky imunohistochemické analýzy vzorků jsou shrnuty v Tabulce 14. GC/nonGC-like fenotyp nebyl v žádné z analyzovaných skupin významně odlišný. Ve skupině PMBL byla v souladu se světovou literaturou potvrzena signifikantně vyšší četnost barvení *CD23* a *CD30* ve srovnání s DLBCL diagnózou.

Tabulka 14. Imunohistochemická analýza nádorových vzorků.

Skupina	nonGC-like	p	<i>CD23</i> +	p	<i>CD30</i> +	p
Kon. PMBL	61%(17/28)	0,618	72%(21/29)	<0,001*	64%(18/28)	<0,001*
Dis. PMBL	90%(9/10)	0,124	40%(4/10)	0,124	80%(8/10)	0,453
Kon. DLBCL	53%(20/38)	0,618	8%(3/39)	<0,001*	15%(6/41)	<0,001*
Dis. DLBCL	50%(1/2)	NA	50%(1/2)	NA	50%(1/2)	NA

Legenda: Statisticky signifikantní data jsou označena hvězdičkou. P v prvním řádku značí p-hodnoty. P-hodnoty u konkordantních PMBL byly získány srovnáním s konkordantními DLBCL. Diskordantní PMBL byly srovnány s konkordantními PMBL. Diskordantní DLBCL s jinými skupinami porovnány nebyly pro příliš nízký počet vzorků v této skupině.

Zastoupení fenotypů v desetičlenné skupině diskordantních PMBL pacientů je uvedeno v Tabulce 15.

Tabulka 15. Rozložení fenotypů v diskordantní PMBL skupině.

Fenotyp	Počet pacientů
<i>nonGC-like/CD23-/CD30-</i>	2
<i>nonGC-like/CD23-/CD30+</i>	4
<i>nonGC-like/CD23+/CD30+</i>	3
<i>GC-like/CD23+/CD30+</i>	1

5. DISKUSE

Difuzní velkobuněčný lymfom je geneticky nehomogenní skupina nádorů, jejíž jednotlivé podjednotky GC-like, nonGC-like a PMBL se značně liší svou prognózou. Z tohoto důvodu je pochopitelná snaha o co nejpřesnější odlišení jednotlivých podtypů u konkrétních pacientů. Za zlatý standard je v současné době považováno vyšetření na genových čípech (5, 15). Jelikož tato metoda není pro svou technickou náročnost a vysokou cenu v praxi dostupná, jsou navrhována různá náhradní, zpravidla imunohistochemická, klasifikační schémata choroby, která obvykle z vyšetření na čípech vycházejí (28). Tyto náhradní algoritmy však často provází velká nepřesnost, např. u nejnámějšího klasifikačního schématu DLBCL dle Hansové je shoda s genovými čipy pouze přibližně 80%. Pro PMBL zatím žádný klasifikační algoritmus nahrazující vyšetření na čípech navržen nebyl. Zásadní problém IHC diagnostiky PMBL spočívá ve velmi nekonstantní pozitivitě eventuálně navrhovaných markerů (3,55,56). Z tohoto důvodu je v předkládané práci stěžejní metodou RTqPCR, která umožňuje vyšetřit genovou expresi limitovaného počtu genů na úrovni mRNA, nikoli IHC, která je v otázce PMBL problematická.

Obecným problémem vyšetření genové exprese na úrovni RNA je nutná dostupnost čerstvě zmražené tkáně. To je úkol náročný jak organizačně (rychlý transport nepoškozeného vzorku z operačního sálu na pracoviště schopné zamrazit vzorek v tekutém dusíku), tak finančně (provoz zamrazovacích nádob). Na druhé straně disponují patologická pracoviště nepřehledným množstvím archivních parafinových vzorků, které jsou prakticky trvale dostupné. Poprvé byla RNA z FFPE tkáně izolována v roce 1988 (40), pro časté nesnáze při zavádění metody však v praxi příliš rozšířená není. Využití parafinu je však velmi výhodné u málo častých diagnóz, jako např. PMBL (1), protože vyšetření archivního materiálu umožní sběr vzorků z více pracovišť a tím rozšíření vyšetřovaného souboru.

Během zavádění metody analýzy genové exprese z FFPE materiálu na našem pracovišti bylo porovnáno několik protokolů a postupů v jednotlivých krocích analýzy a z nejefektivnějších z nich byl sestaven výsledný pracovní protokol. Tímto postupem jsme v současné době schopni analyzovat expresi téměř 100% vzorků, které do laboratoře přijdou (41). V rámci izolace RNA se nejvíce osvědčil komerční kit pravděpodobně pro minimální ztráty RNA příliš častým odpipetováváním supernatantu, které je běžné v jiných izolačních metodách (53). V předkládané práci nebyl potvrzen pozitivní vliv inkubace RNA v TE pufru, patrně pro překročení hranice reverzibility vazeb metylolových skupin v dostupných vzorcích

(44). Kontrola kvality RNA spektrofotometrií je dle předkládaných výsledků vhodná, a to i přesto, že spektrofotometrické hodnoty jsou pod hranicí spolehlivosti měření (0,1; Lambert-Beerův zákon). I tyto hodnoty poskytují základní orientaci v množství izolované RNA a ovlivňují tak další nakládání se vzorkem. V rámci reverzní transkripce je nutno zdůraznit pečlivý výběr reverzní transkriptázy i vyšetřovaných genů. Obecně známé rozdíly v efektivitě reverzních transkriptáz byly patrné i v této práci, a to především v experimentech s nízcí exprimovanými geny. To může být při práci s FFPE zásadní problém. Fluorescenční detekce byla spolehlivější při použití TaqMan sond než při použití SYBR greenu, limitujícím momentem byla častá tvorba dimerů primerů při užití nespecifického fluorescenčního barviva. Při testování vlivu nenádorového pozadí na celkovou genovou expresi bylo zjištěno, že sice k lehkému zvýšení exprese dochází, nicméně toto zvýšení je statisticky zanedbatelné a při dodržení podmínky dostatečného zastoupení nádorových buněk v řezu (80 a více procent) lze výsledky vyšetření nádorové exprese považovat za spolehlivé.

S použitím nově zavedené FFPE metodiky byla následně vyšetřena skupina 82 pacientů s PMBL/DLBCL diagnózou. Cílem práce bylo odlišení obou skupin na úrovni molekulárně genetické, tedy na úrovni, na které pracují genové čipy (6, 15) a která obchází nekonstantní výsledky IHC analýz. Pro práci byly vybrány tři reprezentativní geny odlišující obě podskupiny, a to na základě světové literatury (11,15). Po vyšetření jejich exprese a statistickém zpracování výsledků byla navržena rovnice, tzv. diskriminační rovnice, pomocí které je možné každého nově přichozícího pacienta zařadit geneticky buď do skupiny PMBL nebo DLBCL. Jelikož jako výchozí byla použita všeobecně uznávaná klinicko-patologická klasifikace PMBL/DLBCL (její shoda s vyšetřením na čípech je 76%, (15)) a jelikož mezi ní a předkládanou diskriminační rovnicí nepanuje 100% shoda, rozpadl se původní soubor pacientů celkem do čtyř podskupin: konkordantní PMBL, diskordantní PMBL, konkordantní DLBCL a diskordantní DLBCL. Klinická data byla analyzována s ohledem na toto rozložení pacientů. Vzhledem ke skutečnosti, že na genových čípech byla ve skupině PMBL diagnostikovaných klinicko-patologicky popsána podskupina 24% pacientů, kteří sice klinicko-patologická kritéria PMBL diagnózy splňovali, ale nesli genovou expresi odpovídající DLBCL, byla analýza výše uvedených výsledků zaměřena s velkým zájmem na skupinu diskrepantních PMBL pacientů. Tito pacienti tvořili 26% ze všech klinicko-patologicky očekávaných PMBL, tedy došlo k plné numerické shodě s vyšetřením na genových čípech. Plná numerická shoda s čipy byla zjištěna i ve skupině diskrepantních DLBCL, tedy 5% pacientů (15). Dále diskrepantní PMBL skupina sdílela řadu klinických charakteristik se skupinou konkordantních DLBCL. Jednalo se především o častější infiltraci

sleziny, méně častou vstupní elevaci LDH, vyšší věkový medián pacientů, dále pak tendenci k častějšímu podbráničnímu postižení a méně častému pozorování nádorové sklerózy. Naopak ve srovnání s konkordantními DLBCL pacienti byli diskordantní PMBL pacienti mladší a měli mediastinální masu. Ta byla také zařazovacím klinicko-patologickým kritériem do skupiny očekávaných PMBL. Žádné další klinické charakteristiky nebyly mezi těmito dvěma skupinami statisticky významně odlišné.

Při analýze doby do progresu genetická klasifikace v porovnání s klinicko-patologickou lépe odlišovala pacienty s horší a lepší prognózou. Lze se tedy domnívat, že předkládané výsledky a navrhovaná klasifikace vymezují v rámci klinicko-patologické diagnózy PMBL přibližně čtvrtinu pacientů, kteří svou genovou expresí, prognózou i klinikou spíše připomínají diagnózu DLBCL než PMBL.

Toto odlišení je v současné době důležité ze dvou důvodů. Jednak z hlediska informace pro pacienta, jednak z hlediska zařazování pacientů do klinických studií v rámci testování nových léčebných postupů. Vzhledem k odlišné prognóze diagnóz PMBL a DLBCL může náhodné zařazování pacientů do studií bez znalosti přesné diagnózy ovlivnit výsledky studií.

Jak již bylo zmíněno, IHC charakteristika PMBL tumorů je svízelná. Pro tuto diagnózu neexistují žádné exkluzivní imunohistochemické markery. V předkládané práci byla provedena imunohistochemická analýza souboru z hlediska GC- a nonGC původu tumorů a dále analýza dvou typických molekul zmiňovaných v souvislosti s PMBL – *CD23* a *CD30*. Předkládané výsledky potvrzují častou expresi proteinů *CD23* a *CD30* v PMBL vzorcích, která ale není 100% (3,11,14,55,56). Zajímavé bylo zjištění, že výsledek *CD23/CD30* barvení nijak nezměnil původně očekávanou klinicko-patologickou diagnózu. Tzn., že pacienti s mediastinální masou zůstali po klinicko-patologické rozvaze v očekávané PMBL skupině i přes eventuálně negativní *CD23/CD30* barvení a v klinickém sledování k nim bylo přistupováno jako k PMBL pacientům. A naopak, pacienti s jasnou DLBCL klinikou bez mediastinálního bulky postižení byli klinicko-patologicky nadále považováni za DLBCL pacienty i přes eventuálně pozitivní *CD23/CD30* imunohistochemii. Tyto výsledky dokládají nejistý diagnostický vliv neexkluzivních PMBL markerů *CD23* a *CD30*. V předkládané práci nenesla navíc skupina diskordantních PMBL pacientů žádný typický GC- /nonGC/*CD23/CD30* imunofenotyp, který by umožnil diferencovat ji od ostatních PMBL/DLBCL případů. Získaná data dále potvrzují nevhodnost sklerózy tumoru jako diagnostického kritéria PMBL. Skleróza byla nalezena až ve 33% DLBCL vzorků, ale nikoli ve 100% vzorků PMBL.

Předkládaná práce potvrzuje genetickou nehomogenitu skupiny pacientů, kteří jsou klinicko-patologicky diagnostikováni jako PMBL. Práce navrhuje alternativní, dosud jinými skupinami nepublikovaný, algoritmus k bližší diferenciaci této PMBL skupiny. Správné odlišení diagnózy je důležité vzhledem k odlišné prognóze pacientů. Dosavadní absence spolehlivé diagnostiky PMBL činí rovněž nesnáze ve vyhodnocování prognostických ukazatelů v klinických studiích testujících nové terapeutické postupy u pacientů s hematologickými malignitami. Spolehlivá PMBL diagnostika dále otevírá eventuelní možnosti porovnání různých léčebných strategií mezi skupinami PMBL/DLBCL.

6. ZÁVĚRY PRÁCE

Závěrem lze shrnout podstatné výstupy předkládané práce:

1. Metoda analýzy genové exprese z archivní FFPE tkáně s použitím RTqPCR je technicky možná, dává reprodučibilní výsledky a po úspěšném zavedení dává možnosti rychle vyšetřitelných a zpracovatelných retrospektivních analýz vzorků libovolných diagnóz.

Archivní vzorky i RTqPCR jsou rutinně dostupné. Již zavedená metoda je navíc finančně nenáročná.

a) Izolace RNA z FFPE tkáně je úspěšnější při použití komerčního kitu než při použití některé z modifikací klasické fenolchloroformové metody.

b) Spektrofotometrie je vhodnou metodou pro odhad kvality RNA izolované z FFPE materiálu. I výsledky, které jsou mimo oblast spolehlivosti měření, poskytují dostatečnou informaci důležitou pro další nakládání se vzorkem.

c) Reverzní transkriptázu je nutno volit obezřetně s ohledem na sledované geny a míru jejich exprese. Nízce účinná reverzní transkriptáza může způsobit nedostatečný přepis genů, které jsou ve vstupním vzorku v nízkém počtu kopií. V kombinaci s použitím FFPE materiálu tak může zapříčinit selhání metody.

d) Detekce fluorescenční sondou v RTqPCR experimentech dává při práci s FFPE materiálem reprodučibilní výsledky srovnatelné s výsledky získanými z čerstvé tkáně. Nespecifické interkalační fluorescenční barvivo SYBR green není pro práci s FFPE vzorky vhodné.

2. Při vyšetření genové exprese z tkáňových řezů obsahujících aspoň 80% nádorových buněk je vliv nenádorového stromatu zcela minimální a celé řezy mohou být bez obav použity.

3. Na základě genové exprese tří genů lze v rámci skupiny klinicko-patologicky stanovených PMBL odhalit 26% pacientů, kteří geneticky, klinicky i prognosticky připomínají spíše diagnózu DLBCL. Toto rozlišení je důležité především vzhledem k prognostické odlišnosti diagnóz PMBL a DLBCL. Podobný algoritmus pro odlišení PMBL a DLBCL zatím ve

světové literatuře publikován nebyl. Dosavadní postupy k relevantnímu odlišení obou diagnóz vyžadují vyšetření na genových čípech. Imunohistochemická diagnostika je pro nekonstantní barvení doporučených markerů pouze doplňující a v případě diskrepance s klinicko-patologickou diagnózou hraje dle našich výsledků podřadnou roli a diagnóza klinicko-patologická bývá upřednostněna.

4. Diskrepanční skupiny PMBL (26%) a DLBCL (5%), zjištěné navrhovaným klasifikačním algoritmem, jsou numericky zcela shodné s vyšetřením na genových čípech. Vzhledem k odpovídajícím charakteristikám klinických dat v jednotlivých skupinách se lze domnívat, že se nejedná o výsledek čistě náhodný a lze tak další výzkumné kroky zacílit k přímému porovnání obou metod, tedy RTqPCR a genových čipů.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. TRNĚNÝ, M. - VÁŠOVÁ, I. - PYRLÍK, R. - BELADA, D. - JANKOVSKÁ, - M. KUBÁČKOVÁ, K. - ŠÁLKOVÁ, J. - KOLEŠKOVÁ, E. - HOFMANOVÁ, Ž. - HRABĚTOBÁ, Š. - KAJABA, V. - SÝKOROVÁ, A. - PIMOS, J. - PŘIBYLOVÁ, J. - ŠVECOVÁ, J. - ČIBEROVÁ, J. - BOLOMSKÁ, I. - SKÁCELÍKOVÁ, E. - BREJCHA, M. - ADAMOVÁ, D. - FRAŇKOVÁ, H. - BARSOVÁ, L. - BENEŠOVÁ, K. - ŠENIGL, V. - CAMPR, V. - BOUDOVA, L. - STRÍTESKÝ, J. - PETROVÁ, M. - KREJČOVÁ, H. - PROCHÁZKA, B. - KLENER, P. Distribuce podtypů non-Hodgkinského lymfomu v České Republice a jejich přežití. *Klinická Onkologie*, říjen 2007, roč. 20, č. 5, s. 340-348.
2. SAVAGE, K. J. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Oncologist*, May 2006, vol. 11, no. 5, p. 488-495.
3. MARTELLI, M. - FERRERI, A. J. - JOHNSON, P. Primary mediastinal B-cell lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Dec 2008, vol. 68, no. 3, p. 256-263.
4. BOLETI, E. - JOHNSON, P.W. Primary mediastinal B-cell lymphoma. *Hematological Oncology*, Jun 2007, vol. 25, no. 4, p. 157-163.
5. ALIZADEH, A. A. - EISEN, M. B. - DAVIS, R.E. - MA, C. - LOSSOS, I.S. - ROSENWALD, A. - BOLDRICK, J. - SABET, H. - TRAN, T. - YU, X. - POELL, J.I. - YANG, L. - MARTI, G.E. - MOORE, T. - HUDSON, J. JR. - LU, L. - LEWIS, D.B. - TIBSHIRANI, R. - SHERLOCK, G. - CHAN, W.C. - GREINER, T.C. - WEISENBURGER, D.D. - ARMITAGE, J.O. - WARNKE, R. - LEVY, R. - WILSON, W. - GREVER, M.R. - BYRD, J.C. - BOTSTEIN, D. - BROWN, P.O. - STAUDT, L.M. Distinct types of diffuse large B cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, Feb 2000; vol. 403, no. 6967, p. 503-511.
6. ROSENWALD, A. - WRIGHT, G. - CHAN, W.C. - CONNORS, J.M. - CAMPO, E. - FISHER, R.I. - GASCOYNE, R.D. - MUELLER-HERMEÜLINK, H.K. - SMELAND, E.B. - GILTNAE, J.M. - HURT, E.M. - ZHAO, H. - AVERETT, L. - YANG, L. - WILSON, W.H. - JAFFE, E.S. - SIMON, R. - KLAUSNER, R.D. - POWELL, J. - DUGGEY, P.L. - LONGO, D.L. - GREINER, T.C. - WEISENBURGER, D.D. - SANGER, W.G. - DAVE, B.J. - LYNCH, J.C. - VOSE, J. - ARMITAGE, J.O. - MONSERRAT, E. - LOPEZ-GUILLERMO, A. - GROGAN, T.M. - MILLER, T.P. - LEBLANC, M. - OTT, G. - KVALOY, S. - DELABIE, J. - HOLTE, H. - KRAJCI, P. - STOKKE, T. - STAUDT, L.M. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict

survival after chemotherapy for diffuse large B cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, Jun 2002; vol. 346, no. 25, p. 1937-1947.

7. ROSENWALD, A. – WRIGHT, G. – LEROY, K. – YU, X. – GAULARD, P. – GASCOYNE, R.D. – CHAN, W.C. – ZHAO, T. – HAIOUN, C. – GREINER, T.C.C – WEISENBURGER, D.D. – LYNCH, J.C. – VOSE, J. – ARMITAGE, J.O. – SMELAND, E.B. – KVALOY, S. – HOLTE, H. – DELABIE, J. – CAMPO, E. – MONSERRAT, E. – LOPEZ-GUILLERMO, A., OTT, G. – MUELLER-HERMELINK, H.K. – CONNERS, J.M. – BRAZIEL, R. – GROGAN, T.M. – FISCHER, R.I. – MILLER, T.P. – LEBLANC, M. – CHIORAZZI, M. – ZHAO, H. – YANG, L. – POWELL, J. – WILSON, W.H. – JAFFE, E.S. – SIMON, R. – KLAUSNER, R.D. – STAUDT, L.M. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, Sep 2003, vol. 198, no. 6, p. 851-862.

8. VAN BESIEN, K. – KELTA, M. – BAHAGUNA, P. Primary mediastinal B-cell lymphoma: A review of pathology and management. *Journal of Clinical Oncology*, Mar 2001, vol. 19, no. 6, p. 1855-1864.

9. ISAACSON, P.G. – NORTON, A.J. – ADDIS, B.J. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet*, 1987, no. 2, p. 1488-1491.

10. DUNPHY, C.H. – OMALLEY, D.P. – CHENG, L. – FODRIE, T.Y. – PERKINS, S.L. – KAISER-ROGERS, K. Primary mediastinal B-cell lymphoma: detection of BCL2 gene rearrangements by PCR analysis and FISH. *Journal of Hematopathology*, Sep 2008, vol. 1, no. 2, p. 77-84.

11. SAVAGE, K.J. – MONTI, S. – KUTOK, J.L. – CATTORETTI, G. – NEUBERG, D. – DE LEVAL, L. – KURTIN, P. – DAL CIN, P. – LACID, C. – FEUERHAKE, F. – AGUIAR, R.C. – LI, S. – SALLES, G. – BERGER, F. – JING, W. – PINKUS, G.S. – HABERMANN, T. – DALLA-FAVERA, R. – HARRIS, N.L. – ASTER, J.C. – GOLUB, T.R. – SHIPP, M.A. The molecular signature of mediastinal large B cell lymphoma differs from that of other diffuse large B cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, Dec 2003, vol. 102, no. 12, p. 3871-3879.

12. GUITER, C. – DUSANTER-FOURT, I. – COPIE-BERGMAN, C. – LE GOUVELLO, S. – GAULARD, P. LEROY, K. – CASTELLANO, F. Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*, Jul 2004, vol. 104, no. 2, p. 543-549.

13. MELZNER, I. – BUCUR, A.J. – BRUEDERLEIN, S. – DORSCH, K. – HASEL, C. – BARTH, T.F. – LEITHAEUSER, F. MOELLER, P. Biallelic mutations of SOCS1 impairs JAK2 degradation and sustains phosphor-JAK2 action in MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood*, Mar 2004, vol. 105, no. 6, p. 2535-2542.
14. COPIE-BERGMAN, C. – BOULLAND, ML. – DEHOULLE, C. – MOELER, P. – FARCET, J.P. – DYER, M.P. – HALOUN, C. – ROMEO, P.H. – GAULARD, P. – LEROY, K. Interleukin 4-induced gene 1 is activated in primary mediastinal B cell lymphoma. *Blood*, Apr 2003, vol. 101, no. 7, p. 2756-2761.
15. ROSENWALD, A. – WRIGHT, G. – LEROY, K. – YU, X. – GAULARD, P. – GASCOYNE, R.D. – CHAN, W.C. – ZHAO, T. – HAIOUN, C. – GREINER, T.C.C – WEISENBURGER, D.D. – LYNCH, J.C. – VOSE, J. – ARMITAGE, J.O. – SMELAND, E.B. – KVALOY, S. – HOLTE, H. – DELABIE, J. – CAMPO, E. – MONSERRAT, E. – LOPEZ-GUILLERMO, A., OTT, G. – MUELLER-HERMELINK, H.K. – CONNERS, J.M. – BRAZIEL, R. – GROGAN, T.M. – FISCHER, R.I. – MILLER, T.P. – LEBLANC, M. – CHIORAZZI, M. – ZHAO, H. – YANG, L. – POWELL, J. – WILSON, W.H. – JAFFE, E.S. – SIMON, R. – KLAUSNER, R.D. – STAUDT, L.M. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, Sep 2003, vol. 198, no. 6, p. 851-862.
16. HUNT, K.E. – REICHARD, K.K. Diffuse large B cell lymphoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, Jan 2008, vol. 132, no. 1, p. 118-124.
17. LOSSOS, I.S. – JONES, C.D. – WARNKE, R. – NATKUNAM, Y. – KAIZER, H. ZEHNDER, J.L. – TIBSHIRANI, R. – LEVY, R. Expression of a single gene, Bcl6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Blood*, Aug 2001, vol. 98, no. 4, p. 945-951.
18. LOSSOS, I.S. – MORGENSZTERN, D. Prognostic biomarkers in diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, Feb 2006, vol. 24, no. 6, p. 995-1007.
19. ENNISHI, D. – TAKEUCHI, K. – YOKOYAMA, M. – ASAI, H. – MISHIMA, Y. – TERUI, Y. – TAKAHASHI, S. – KOMATSU, H. – IKEDA, K. – YAMAGUCHI, M. – SUZUKI, R. – TANIMOTOT, M. – HATAKE, K. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Annals of Oncology*, Nov 2008, vol. 19, no. 11, p. 1921-1926.
20. LOSSOS, I.S. – CZERWINSKI, D.K. – ALIZADEH, A.A. – WECHSER, M.A. – TIBSHIRANI, R. – BOTSTEIN, D. – LEVY, R. Prediction of survival in diffuse large B cell

lymphoma based on the expression of six genes. *New England Journal of Medicine*, Apr 2004, vol. 350, no. 18, p. 1828-1837.

21. SHIPP, M.A. – ROSS, K.N. – TAMAYO, P. – WENG, A.P. – KUTOK, J.L. – RICARDO, C.T. – GAASENBEEK, M. – ANGELO, M. – REICH, M. – PINKUS, G.S. – AGUIAR, R.C. – RAY, T.S. – KOVAL, M.A. – LAST, K.W. – NORTON, A. – LISTER, T.A. – MESIROV, J. – NEUBERG, D.S. – LANDER, E.S. – ASTER, J.C. – GOLUB, T.R. Diffuse large B cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. *Nature Medicine*, Jun 2002; no. 8, 68-74.
22. JAIS, J.P. – HAIOUN, C. – MOLINA, T.J. – RICKMAN, D.S. – DE REYNIES, A. – BERGER, F. – GISSELBRECHT, C. – BRIERE, J. – REYES, F. – GAULARD, P. – FEUGIER, P. – LABOUYRIE, E. – TILY, H. – BASTARD, C. – COIFFIER, B. – SALLES, G. – LEROY, K. – Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. The expression of 16 genes related to the cell of origin and immune response predicts survival in elderly patients with diffuse large B cell lymphoma treated with CHOP and Rituximab. *Leukemia*, Oct 2008, vol. 22, no. 10, p. 1917-1924.
23. RIMSZA, L.M. – LEBLANC, M.L. – UNGER, J.M. – MILLER, T.P. – GROGAN, T.M. – PERSKY, D.O. – MARTEL, R.R. – SABALOS, C.M. – SELIGMAN, B. – BRAZIEL, R.M. – CAMPO, E. – ROSENWALD, A. – CONNORS, J.M. – SEHN, L.H. – JOHNSON, N. – GASCOYNE, R.D. Gene expression predicts overall survival in paraffin embedded tissues of diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, Oct 2008, vol. 112, no. 8, p. 3425-3433.
24. COLOMO, L. – LOPEZ-GUILLERMO, A. – PERALES, M. – RIVERS, S. – MARTINEZ, A. – BOSCH, F. – COLOMER, D. – FALINI, B. – MONSERRAT, E. – CAMPO, E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Blood*, Jan 2003, vol. 101, no. 1, p. 78-84.
25. ZINZANI, P. L. – DIRNOHOFER, S. – SABATTINI, E. – ALINARI, L. – PICCALUGA, P.P. – STEFONI, V. – TANI, M. – MUSURACA, G. – MARCHI, E. – FALINI, B. – BACCARANI, M. – PILERI, S.A. Identification of outcome predictors in diffuse large B cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated de novo tumors with nodal presentation on tissue microarrays. *Haematologica*, Jun 2005, vol 90, no. 3, 341-347.
26. CHANG, C.C. – MCCLINTOCK, S. – CLEVELAND, R.P. – TRZPUC, T. – VESOLE, D.H. – LOGAN, B. – KAJDACSZY-BALLA, A. – PERKINS, S.L. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis

- in diffuse large B cell lymphoma. *American Journal of Surgical Pathology*, Apr 2004, vol. 28, no. 4, p. 464-470.
27. MURIS, J.J. – MEIJER, C.J. – VOS, W. – VAN KRIEKEN, J.H. – JIWA, N.M. – OSSENKOPPELE, G.J. – OUDEJANS, J.J. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of Pathology*, Apr 2006, vol. 208, no. 5, p. 714-723.
28. HANS, C.P. – WEISENBURGER, D.D. – GREINER, T.C. – GASCOYNE, R.D. – DELABIE, J. OTT, G. – MUELLER-HERMELINK, H.K. – CAMPO, E. – BRAZIEL, R.M. – JAFFE, E.S. – ZENGGANG, P. – FARINHA, P. – SMITH, L.M. – FALINI, B. – BANHAM, A.H. – ROSENWALD, A. – STAUDT, L.M. – CONNORS, J.M. – ARMITAGE, J.O. – CHAN, W.C. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, Jan 2004, vol. 103, no. 1, p. 275-282.
29. CHANG, C.C. – LIU, Y.C. – CLEVELAND, R.P. – PERKINS, S.L. Expression of c-myc and p53 correlates with clinical outcome in diffuse large B cell lymphomas. *American Journal of Clinical Pathology*, Jan 2000, vol. 113, p. 512-518.
30. BARTH, T.F. – LEITHAEUSER, F. – JOOS, S. – BENTZ, M. – MOELLER, P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? *Lancet Oncology*, Apr 2002, vol. 3, no. 4, 229-234.
31. SAVAGE, K.J. – AL-RAJHI, N. – VOSS, N. – PALTIEL, C. – KLASA, R. – GASCOYNE, R.D. – CONNORS, J.M. Favorable outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma in a single institution: British Columbia experience. *Annals of Oncology*, Jan 2006, vol. 17, no. 1, 123-130.
32. KIMM, L.R. – DE LEEUW, R.J. – SAVAGE, K.J. – ROSENWALD, A. – CAMPO, E. – DELABIE, J. – OTT, G. – MUELLER-HERMELINK, H.K. – JAFFE, E.S. – RIMSZA, L.M. – WEISENBURGER, D.D. – CHAN, W.C. – STAUDT, L.M. – CONNORS, J.M. – GASCOYNE, R.D. – LAM, W.L. Frequent occurrence of deletions in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, Dec 2007, vol. 46, no. 12, 1090-1097.
33. WESSENDORF, S. – BARTH, T.F. – VIARDOT, A. – MUELLER, A. – KESTLER, H.A. – KOHLHAMMER, H. – LICHTER, P. – BENTZ, M. – DOEHNER, H. – MOELLER, P. – SCHWAENEN, C. Further delineation of chromosomal consensus regions in primary mediastinal B-cell lymphomas: an analysis of 37 tumor samples using high-resolution genomic profiling (array-CGH). *Leukemia*, Dec 2007, vol. 21, no. 12, p. 2463-2469.

34. ENDERS, G. Gene profiling--chances and challenges. *Acta Neurochirurgica*, Jul 2004, vol. 89, p. 9-13.
35. SHEN, Y. – IQBAL, J. – HUANG, J.Z. – ZHOU, G. – CHAN, W.C. Bcl2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells. *Blood*, Nov 2004, vol. 104, no. 9, p. 2936-2939.
36. DE JONG, D. – XIE, W. – ROSENWALD, A. – CHANABHAI, M. – GAULARD, P. – KLAPPER, W. – LEE, A. – SANDER, B. – THORNS, C. – CAMPO, E. – MOLINA, T. – NORTON, A. – HAGENBEEK, A. – HORNING, S. – LISTER, A. – RAEMAEEKERS, J. – GASCOYNE, R.D. – SALLES, G. WELLER, E. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications (a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium). *Journal of Clinical Pathology*, Mar 2007, vol. 25, no. 7, p. 128-138.
37. CHOI, W.W. – WEISENBURGER, D.D. – GREINER, T.C. – PIRIS, M.A. – BANHAM, A.H. – DELABIE, J. – BRAZIEL, L.M. – GENG, H. – IQBAL, J. – LENZ, G. – VOSE, J.M. – HANS, C.P. – FU, K. – SMITH, L.M. – LI, M. – LUI, Z. – GASCOYNE, R.D. – ROSENWALD, A. – OTT, G. – RIMSZA, L.M. – CAMPO, E. – JAFFE, E.S. – JAYE, D.L. – STAUDT, L.M. – CHAN, W.C. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clinical Cancer Research*, Sep 2009, vol. 15, no. 17, p. 5494-5502.
38. SAVAGE, K.J. – MONTI, S. – KUTOK, J.L. – CATTORETTI, G. – NEUBERG, D. – DE LEVAL, L. – KURTIN, P. – DAL CIN, P. – LADD, C. – FEUERHAKE, F. – AGUIAR, R.C.T. – LI, S. – SALLES, G. – BERGER, F. – JING, W. – PINKUS, G.S. – HABERMANN, T. – DALLA, VERE, R. – HARRIS, N.L. – ASTER, J.C. – GOLUB, T.R. – SHIPP, M.A. The molecular signature of mediastinal large B cell lymphoma differs from that of other diffuse large B cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, Dec 2003, vol. 102, no. 12, p. 3871-3879.
39. RODIG, S.J. – SAVAGE, S.J. – LACASCE, A.S. – WENG, A.P. – HARRIS, N.L. – SHIPP, M.A. – HSI, E.D. – GASCOYNE, R.D. – KUTOK, J.L. Expression of TRAF1 and nuclear c-Rel distinguishes primary mediastinal large cell lymphoma from other types of diffuse large B cell lymphoma. *American Journal of Surgical Pathology*, Jan 2007, vol. 31, no. 1, p. 106-112.
40. RUPP, G.M. – LOCKER, J. Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques*, Jan 1988, vol. 6, no. 1, 56-60.

41. VOTAVOVÁ, H. – FORSTEROVÁ, K. – STRÍTESKÝ, J. – VELENSKÁ, Z. – TRNĚNÝ, M. Optimized protocol for gene expression analysis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Diagnostic Molecular Pathology*, Sep 2009, vol. 18, no. 3, 176-82.
42. CHROMCZYNSKI, P. – SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, Apr 1987, vol. 162, no. 1, 156-159.
43. LEHMANN, U. – KREIPE, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, Dec 2001, vol. 25, no. 4, 409-418.
44. MASUDA, N. – OHNISHI, T. – KAWAMOTO, S. – MONDEN, M. – OKUBO, K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Research*, Dec 1999, vol. 27, no. 22, p. 4436-4443.
45. LI, J. – SMYTH, P. – CAHILL, S. – DENNING, K. – FLAVIN, R. – AHERNE, S. – PIROTTA, M. – GUENTHER, S.M. – OLEARY, J.J. – SHEILS, O. Improved RNA quality and TaqMan Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. *BMC Biotechnology*, Feb 2008, p. 8-10.
46. BUSTIN, S.A. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, California, USA, 2004. 882 s. ISBN 0-9636817-8-8. Chapter 2, Real-Time RT-PCR: What lies beneath the surface, p. 47-85.
47. BUSTIN, S.A. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, California, USA, 2004. 882 s. ISBN 0-9636817-8-8. Chapter 1, Quantification of nucleic acids by PCR, p. 3-46.
48. BUSTIN, S.A. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, California, USA, 2004. 882 s. ISBN 0-9636817-8-8. Chapter 6, Chemistries, p. 215-278.
49. BUSTIN, S.A. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, California, USA, 2004. 882 s. ISBN 0-9636817-8-8. Chapter 11, Data analysis and interpretation, p. 439-492.
50. LEWIS, F. – MAUGHAN, N.J. – SMITH, V. – HILLAN, K. – QUIRKE, P. Unlocking the archive – gene expression in paraffin embedded tissue. *The Journal of Pathology*, Sep 2001, vol. 195, no. 1, p. 66-71.
51. SRINIVASAN, M. – SEDMAK, D. – JEWELL, S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *American Journal of Pathology*, Dec 2002, vol. 161, no. 6, p. 1961-1971.

52. BAYERS, R. – ROEBUCK, J. – SAKHINIA, E. – HOYLAND, J. PolyA PCR amplification of cDNA from RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Diagnostic Molecular Pathology*, Sep 2004, vol. 13, no. 3, p. 144-150.
53. GILBERT, M.T. – HASELKORN, T. – BUNCE, M. – SANCHEZ, J.J. – LUCAS, S.B. – JEWELL, L.D. – VAN MARK, E. – WOROBEY, M. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues—which methods are useful when? *PLoS ONE*, Jun 2007, vol. 2, no. 6, e537.
54. TAN, L.H. A practical approach to the understanding and diagnosis of lymphoma: an assessment of the WHO classification based on immunoarchitecture and immuno-ontogenic principles. *Pathology*, Dec 2009, vol. 41, no. 4, p. 305-26.
55. PILERI, S.A. – ZINZANI, P.L. – GAIDANO, G. – FALINI, B. – GAULARD, P. – ZUCCA, E. – SABATTINI, E. – ASCANI, S. – ROSSI, M. – CAVALLI, F. – International Extranodal Lymphoma Study Group. Pathobiology of primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, Mar 2003, vol. 44, suppl. 21-26.
56. CALAMINICI, M. – PIPER, K. – LEE, A.M. – NORTON, A.J. CD23 expression in mediastinal large B-cell lymphomas. *Histopathology*, Dec 2004, vol. 45, no. 6, p. 619-624.
57. BASSO, K. – SAITO, M. – SUMAZIN, .P. – MARGOLIN, A.A. – WANG, K. – LIM, W.K. – KITAWAGA, Y. – SCHNEIDER, C. – ALVAREZ, M. – CALIFANO, A. – DALLA-FAVERA, R. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood*, Feb 2010, vol. 115, no. 5, p. 975-984.
58. LU, X. – NECHUSHTAN, H. – DING, F. – ROSADO, M.F. – SINGAL, R. – ALIZADEH, A.A.- LOSSOS, I.S. Distinct IL-4-induced gene expression, proliferation and intracellular signaling in germinal center B cell-like and activated B cell-like diffuse large B cell lymphomas. *Blood*, Apr 2005, vol. 105, no. 7, p. 2924-2932.
59. LU, R. Interferon regulatory factor 4 and 8 in B cell development. *Trends in Immunology*, Oct 2008, vol. 29, no. 10, p. 487-492.
60. VAN DER STOEP, N. – QUINTEN, E. – MARCONDES REZENDE, M. – VAN DEN ELSEN, P.J. E47, IRF-4 and Pu.1 synergize to induce B-cell-specific activation of the class II transactivator promoter III (CIITA-PIII). *Blood*, Nov 2004, vol. 104, no. 9, p. 2849-2857.
61. BERGLUND, M. – THUNBERG, U. – AMINI, R.M. – BOOK, M. – ROOS, G. – ERLANSON, M. – LINDEROTH, J. – DICTOR, M. – JERKEMAN, M. – CAVALLIN-STAHL, E. – SUNDSTROM, C. – REHN-ERIKSSON, S. – BACKLIN, C. – HAGBERG, H. – ROSENQUIST, R. – ENBLAD, G. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B cell

lymphoma and its impact on prognosis. *Modern Pathology*, Aug 2005, vol. 18, no. 8, p. 1113-1120.

62. SJOE, L.D. – POULSEN, C.B. – HANSEN, M. – MOLLER, M.B. – RALFKIAER, E. Profiling of diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. *European Journal of Haematology*, Dec 2007, vol. 79, no. 6, p. 501-507.

63. UHEROVA, P. – ROSS, C.W. – SCHNITZER, B. – SINGLETON, T.P. – FINN, W.G. The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B cell lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, Apr 2001, vol. 115, no. 4, p. 582-588.

64. DE JONG, D. – ROSENWALD, A. – CHANABHAI, M. – GAULARD, P. – KLAPPER, W. – LEE, A. – SANDER, B. – THORNS, C. – CAMPO, E. – MOLINA, T. –NORTON, A. – HAGENBEEK, A. – HORNING, S. – LISTER, A. – RAEMAEKERS, J. – GASCOYNE, R.D. – SALLES, G. WELLER, E. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications – a study from Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Journal of Clinical Oncology*, Mar 2007, Vol. 25, no. 7, p. 805-812.

