

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



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

MUDr. Hana Votavová

2010

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: 1. Interní klinika VFN a 1. LF UK

Školitel: Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Ivan Špička, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před  
konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné  
podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky  
Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## **OBSAH**

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
1. Úvod.....	7
1.1 Molekulární genetiky PMBL a DLBCL.....	7
1.2 Klinika nemediastinálního DLBCL.....	7
1.3 Klinika PMBL.....	8
1.4 Terapie DLBCL/PMBL.....	9
1.5 Diagnosticky využívané metody.....	9
1.6 Geny vyšetřované v předkládané práci pomocí RTqPCR.....	10
1.7 Vyšetřované imunohistochemické markery.....	10
2. Hypotézy a cíle práce.....	12
2.1 Hypotézy.....	12
2.2 Cíle práce.....	12
3. Materiál a metodika.....	14
3.1 Metody I.....	14
3.1.1 Izolace RNA z parafinových bloků.....	14
3.1.2 Kontrola kvality RNA.....	14
3.1.3 Reverzní transkripce (RT) a kvalitativní PCR.....	15
3.1.4 RTqPCR.....	15
3.1.5 Statistika.....	15
3.2 Metody II.....	16
3.3 Metody III.....	16
3.3.1 Statistika.....	16
4. Výsledky.....	17
4.1 Výsledky I.....	17
4.1.1 RNA izolace z FFPE tkáně.....	17
4.1.2 Spektrofotometrická analýza RNA.....	17
4.1.3 Reverzní transkripce a kvalitativní PCR.....	17
4.1.4 Porovnání detekce fluorescence pomocí SYBR green a vlastní Taqman sondy.....	17
4.1.5 Porovnání vlastní a komerční Taqman sondy.....	18
4.1.6 Sestavení konečného protokolu a jeho ověření.....	18

4.2 Výsledky II.....	18
4.3 Výsledky III.....	19
4.3.1 Genová exprese v testovacím setu a predikční rovnice.....	19
4.3.2 Analýza klinických charakteristik souboru... 20	
4.3.3 Diskordantní versus konkordantní PMBL pacienti.....	20
4.3.4 Diskordantní PMBL versus konkordantní DLBCL pacienti.....	21
4.3.5 Diskordantní DLBCL pacienti.....	21
4.3.6 Analýza přežití.....	21
4.3.7 Imunohistochemická analýza nádorových vzorků.....	21
5. Diskuse.....	23
6. Závěry.....	26
7. Použitá literatura.....	28
Seznam Publikací.....	34

## **ABSTRAKT**

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 parafrinových 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.

## **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.

## **1. ÚVOD**

Předkládaná práce se zabývá zlepšením diagnostiky primárně mediastinálního B-lymfomu (PMBL) a difuzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL). Vzhledem k tomu, že tato dvě onemocnění jsou od sebe t.č. odlišitelná pouze s využitím technicky a finančně náročné metody genových čipů/mikroarray, zaměřili jsme se v první části práce především na vyvinutí obecně dostupnější metodiky klasifikace. Ve druhé části projektu byla provedena vlastní diagnostika uvedených skupin lymfomů a podrobná analýza klinických dat.

### **1.1 Molekulární genetika PMBL a DLBCL**

Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) tvoří přibližně 45% z nově diagnostikovaných non-Hodgkinských lymfomů (NHL)(1).

V roce 2000 (2) a následně 2002 (3) byl DLBCL na základě genové exprese rozdělen do podskupin GC (germinal center - like), ABC (activated B cell - like) a tzv. typ 3, a to s použitím genových čipů/mikroarray. Celkové pětileté přežití bylo 60% ve skupině GC, 39% ve skupině typ 3 a 35% ve skupině ABC DLBCL. Skupiny jsou imunohistochemicky neodlišitelné.

V roce 2003 byla identifikována skupina PMBL jako další genetická podskupina DLBCL (4). Je jím jako zvláštní diagnostickou podjednotkou DLBCL postiženo 2-5% pacientů s NHL. (1). Obecně se předpokládá, že vychází z CD19+/CD21- tymických medulárních buněk (5,6).

Pomocí genových čipů bylo zjištěno, že 24% pacientů s klinicko-patologicky stanovenou diagnózou PMBL nenese odpovídající genovou expresi a podobá se geneticky a prognosticky spíše DLBCL, přičemž není možno tyto pacienty odlišit jinak než vyšetřením na genových čipech (4).

### **1.2 Klinika nemediastinálního DLBCL**

Nemediastinální DLBCL (dále jen DLBCL) postihuje starší pacienty s mediánem sedmé věkové dekády a má agresivní průběh s potenciální kurabilitou. V době diagnózy může být zjištěno

extranodální postižení, zvýšená hladina laktátdehydrogenázy a infiltrace kostní dřevě. V predikci přežití pacientů má výsadní postavení mezinárodní prognostický index (IPI), hodnotící 5 nezávislých klinických charakteristik: věk, klinické stadium choroby v době diagnózy, hladina sérové laktátdehydrogenázy, výkonnostní stav a extranodální postižení.

V posledních letech byla publikována řada prognostických markerů vyšetřovaných buď na úrovni genů nebo proteinů, analyzovaných jednotlivě i ve skupinách. Za prognosticky příznivý znak bývá považována např. exprese molekul LMO2 (7), CD23 (7) nebo Bcl6 (8), za nepříznivý např. zvýšená exprese cyklinů D2 a D3 nebo survivinu (9). U mnohých jednotlivě posuzovaných markerů jsou však údaje o jejich prognostickém významu nejednotné.

V roce 2004 byl publikován prognostický model založený na expresi šesti genů (10). Geny LMO2, Bcl6 a FN1 byly 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 (11,12,13). 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 (14,15,16,17,18). S výjimkou algoritmu Hansové et al. ((18), tzn. barvení CD10, Bcl6 a MUM1) se ale v dosavadní praxi žádné schéma neujalo.

### **1.3 Klinika PMBL**

Proti klasickému DLBCL jsou pro PMBL 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 dřevě

infiltrována nebývá. V současné době je PMBL považován za onemocnění s lepší prognózou než klasický DLBCL (5,6).

V histologickém vyšetření není PMBL od klasického nemediastinálního DLBCL spolehlivě odlišitelný (5,6).

#### 1.4 Terapie DLBCL/PMBL

Standardní léčbou DLBCL/PMBL je antracykliny obsahující chemoterapeutický režim kombinovaný s rituximabem (protilátka anti-CD20), eventuálně doplněný radioterapií a transplantací kostní dřeně (1).

#### 1.5 Diagnosticky využívané metody

Molekulární subklasifikace DLBCL byla provedena na genových čípech. Ty sice umožňují současnou analýzu tisíců genů z jednoho vzorku, metoda je ale technicky náročná a drahá a vyžaduje čerstvě zmraženou tkáň.

Imunohistochemie (IHC) pracuje s běžně dostupným parafinovým blokem (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, FFPE). Na rozdíl od čipů nevyšetřuje expresi genu, ale proteinu a není spolehlivě kvantifikovatelná. IHC algoritmus pro klasifikaci DLBCL (18) rozlišuje skupinu GC-like (GC) a nonGC-like (ABC + typ 3) a shoduje se s vyšetřením na čípech jen v 80%. Pro IHC odlišení PMBL podskupiny žádné obecné schéma neexistuje. Jsou uváděny postupy využívající např. barvení proteinů MAL, STAT či TRAF (19,20). Jejich pozitivita však u PMBL lymfomů není konstantní.

RTqPCR vyšetřuje menší množství genů než čipy, je levnější a proti čipům má lepší kvantifikační přesnost. Jako vstupní materiál lze použít čerstvě zmraženou nebo FFPE tkáň. Při vyšetření FFPE vzorků narážíme na degradaci a chemickou modifikaci RNA (21,22), metoda ale dává možnost retrospektivních analýz.

RTqPCR metoda vyšetření genové exprese sestává z několika kroků:

1. Izolace nukleové RNA. Základní metodou je metoda dle Chromczynského a její modifikace pro FFPE tkáň.

2. Kontrola kvality RNA elektroforetický (pro degradaci RNA nevhodné pro FFPE) a spektrofotometricky.

3. Reverzní transkripce RNA do komplementární DNA, tzv. cDNA. Pro FFPE RNA je vhodné užití random hexamerových primerů.

4. Provedení a analýza vlastní RTqPCR reakce. Metoda fluorescenčně detekuje postupně narůstající množství PCR produktů již aktuálně v průběhu reakce. Detekce může být nespecifická (SYBRgreen) pro jakoukoli dvouvláknovou DNA nebo sekvenčně specifická (Taqman sondy). Kvantifikovat lze absolutně podle kalibrační křivky nebo relativně k referenčnímu genu.

#### 1.6 Geny vyšetřované v předkládané práci pomocí RTqPCR

Předkládaná práce se zabývá zlepšením diagnostiky podtypů NHL s využitím genové exprese. Na základě mikročipových dat publikovaných jinými skupinami byly vybrány geny *CD23* a *Pdl2* jako zástupci exprese PMBL a *Blk* jako zástupce pro skupinu DLBCL.

*CD23* (human leukocyte differentiation antigen, FCER2) se účastní v B-buněčné aktivaci a růstu a je zvýšeně exprimován u PMBL (19).

*Pdl2* gen (programme cell dech 1 ligand 2) je regulátorem T-buněčné odpovědi. Má jak proliferační, tak proapoptotické účinky a je zvýšeně exprimovaný v PMBL (4).

*Blk* (B-lymphoide tyrosine kinase) je tyrosinkináza ze skupiny Src-kináz, uplatňující se v BCR signální kaskádě. Její exprese je významně snížena v PMBL buňkách (19).

#### 1.7 Vyšetřované imunohistochemické markery

CD20 je povrchový antigen B-lymfocytů a pro svou pozitivitu u tumorů vycházejících z B-buněk patří k základním vyšetřovaným markerům hematologických malignit. Molekula hraje roli ve vývoji a diferenciaci B-lymfocytů do buněk plasmatických (2).

CD5 je dalším standardně vyšetřovaným antigenem hematoonkologických biopsií. Je pozitivní ve většině případů chronické lymfocytární leukémie a lymfomů z plášťové zóny (23).

CD30 molekula je exprimována aktivovanými T a B buňkami a pozitivně reguluje apoptózu. Z hematologických malignit bývá pozitivní u anaplastických velkobuněčných lymfomů, Hodgkinova lymfomu a PMBL. Ačkoli je barvení CD30 pozitivní u většiny PMBL, je velmi slabé a jeho hodnocení je svízelné (24,25).

CD23 pozitivní imunohistochemie je popsána přibližně u 70% PMBL a 15% DLBCL (26).

Bcl6 (B-cell CLL/lymphoma 6) je transkripční represor v B-lymfocytech s velmi komplexním vlivem 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 (27). Je součástí klasifikačního algoritmu dle Hansové.

MUM1/IRF4 (multiple myeloma oncogene 1 / interferon regulatory factor 4) je klasickým představitelem ABC/nonGC podskupiny DLBCL (2,18). Tento gen je důležitý pro vývoj a diferenciaci B-lymfocyty a pro formaci germinálního centra (25,26). Patří rovněž do DLBCL imunohistochemického klasifikačního algoritmu.

CD10 antigen (MME, membrane metallo-endopeptidase) je součástí algoritmu IHC klasifikace DLBCL dle Hansové.

V předkládané práci byl dále s jeho pomocí sledován vliv nenádorového pozadí vzorků na celkově zjištěnou genovou expresi. CD10 pozitivitu nemají totiž ve vzorcích pouze buňky nádorové, ale nekonstantně i nenádorové buňky nádorového stromatu (28). Ty lze odlišit imunohistochemicky, ale nikoli při vyšetření genové exprese z celého vzorku.

## **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 parafrinových 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.

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.

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1 Metody I**

Stěžejní metody předkládaného projektu jsou RTqPCR a IHC, je využíván FFPE materiál. V IHC byly hodnoceny již v minulosti zavedené markery, metoda vyšetření genové exprese z FFPE řezů byla nejprve zaváděna. Pro optimalizaci bylo vstupně použito 25 parafinových bloků od pacientů s DLBCL v tzv. testovacím setu. Počet použitých bloků v jednotlivých krocích (izolace RNA, spektrofotometrie, reverzní transkripce, RTqPCR) testování se liší. Záměrně byly zařazeny i bloky, ze kterých byla izolována RNA velmi nízké kvality. Po analýze výsledků z testovacího setu byl sestaven optimální protokol jednotlivých kroků. Ten byl následně ověřován v tzv. validačním setu 65 FFPE bloků.

##### **3.1.1 Izolace RNA z parafinových bloků**

Do testování izolace RNA bylo zařazeno celkem 8 parafinových bloků. Z každého z nich byly zhotoveny 4 paralelní vzorky (každý vzorek 4 řezy po 10 µm), na kterých byly srovnány čtyři izolační protokoly:

1. Izolace pomocí kitu High Pure RNA Paraffin Kit (Roche).
2. Klasická Chromezynského guanidin-fenol-chloroformová (GFCH) metoda po deparafinizaci vzorku xylenem s rozpuštěním RNA ve vodě.
3. Klasická GFCH metoda, jak je uvedena v bodu 2, RNA byla ale rozpuštěna v 10 µl TE pufru (22).
4. GFCH metoda s rozpuštěním vzorků v TE pufru (viz bod 3) a zahřátím vzorků na 70°C po dobu 60 minut (22).

##### **3.1.2 Kontrola kvality RNA**

Kontrola kvality RNA z čerstvých leukocytů byla provedena elektroforézou na 1% agaróze. V následné spektrofotometrii byla měřena absorbance vzorků, spočítán poměr 260/280 a koncentrace vzorku. RNA izolovaná z FFPE byla analyzována

spektrofotometricky na 44 FFPE vzorcích získaných celkem z 25 parafinových bloků.

### 3.1.3 Reverzní transkripce (RT) a kvalitativní PCR

Reverzní transkripce byla optimalizována na RNA z čerstvých leukocytů. Byly porovnány tři RT kity od různých dodavatelů. Vstupní množství RNA bylo 1 µg a výsledek byl vyhodnocen pomocí kvalitativní PCR pro geny β-2-mikroglobulin (*B2M*), hypoxantinfosforibosyltransferáza 1 (*HPRT1*) a TATA box binding protein (*TBP*). PCR produkty byly vizualizovány na 10% polyakrylamidových gelech.

RT RNA získané z FFPE tkáně byla po optimalizaci metody prováděna kitem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit firmy Fermentas.

### 3.1.4 RTqPCR

Pro RTqPCR experimenty byly použity vzorky z celkem osmi parafinových bloků. Z každého bloku byl jeden vzorek izolován kitem (Roche), čtyři z uvedených bloků byly rovněž použity k izolaci čtyř vzorků pomocí GFCH metody (nízká kvalita RNA). 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).

RTqPCR byla prováděna na přístroji Strategene 3000 Xp cykler, analyzovány byly geny *B2m* a *Hprt1*.

Po analýze výsledků jednotlivých kroků (izolace RNA, kontrola její kvality, reverzní transkripce a RTqPCR) byl sestaven a na skupině 65 vzorků ověřen finální protokol.

### 3.1.5 Statistika

Pro srovnání kvality RNA izolace byl použit Duncanův post hoc test mnohonásobného srovnávání. Pro analýzu spektrofotometrických výsledků byl použit model logistické regrese a

lineární diskriminační analýza. Vlastní a komerční Taqman sondy byly srovnány pomocí analýzy rozptylů.

### 3.2 Metody II

V této části práce je na 69 vzorcích sledován vliv nespecifického genového pozadí na výslednou genovou expresi CD10 markeru. RTqPCR analýza byla provedena finálním protokolem (viz Metody I). Imunohistochemické barvení CD10 (Novocastra, ředění 1:80) bylo provedeno podle standardního protokolu. Pro vyhodnocení byl použit Mann-Whitney test.

### 3.3 Metody III

V této stati je provedena analýza genové exprese PMBL a DLBCL. 39/82 pacientů mělo klinicko-patologicky stanovenou diagnózu PMBL (histologie DLBCL, mediastinální masa nad 6cm), ostatní diagnózu DLBCL. Byly vyšetřeny RTqPCR a IHC markery popsané v úvodu. Na testovacím setu 11 PMBL a 21 DLBCL byla provedena analýza RTqPCR genové exprese a byla navržena diskriminační rovnice, která přiřazuje na základě exprese genů vzorky do genetických skupin PMBL a DLBCL. Touto rovnicí byl zpětně testován celý soubor 82 pacientů. Všechny vzorky byly rovněž vyšetřeny a zařazeny pomocí algoritmu Hansové do podskupin GC-like a nonGC-like DLBCL.

#### 3.3.1 Statistika

Genová exprese PMBL a DLBCL byla analyzována Wilcoxonovým testem. Diskriminační rovnice byla generována kanonickou diskriminační funkcí. Přežití bez progresu bylo analyzováno pomocí Kaplan-Meierových křivek a log-rank testu. Orgánové postižení mezi skupinami PMBL a DLBCL bylo srovnáno pomocí kontingenčních tabulek.



## **4. VÝSLEDKY**

### **4.1 Výsledky I**

#### **4.1.1 RNA izolace z FFPE tkáně**

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 reakce přibližně o pět cyklů později.

#### **4.1.2 Spektrofotometrická analýza RNA**

Byly testovány čtyři možné prediktory kvality PCR reakce: absorbance vzorku při vlnové délce 260 nm, při vlnové délce 280 nm, koncentrace izolované RNA a množství izolované RNA. Pouze množství izolované RNA ze vzorku mělo výpovědní hodnotu z hlediska predikce kvality PCR ( $p = 0,003$ ). Hraniční množství izolované RNA pro dobrou PCR reakci je 5700 ng na vzorek. Poměr 260/280 pro RNA z FFPE tkáně byl průměrně 1,5 bez rozdílu mezi v PCR dobře reagujícími a nereagujícími vzorky ( $p = 0,76$ ).

#### **4.1.3 Reverzní transkripce a kvalitativní PCR**

RevertAid reverzní transkriptáza (Fermentas) úspěšně přepsala RNA do cDNA v 92% reakcí, Transcriptor (Roche) ve 100% a TopBio reverzní transkriptáza v 73% reakcí.

#### **4.1.4 Porovnání detekce fluorescence pomocí SYBR green a vlastní Taqman sondy**

Byla vyšetřována exprese genů *B2m* a *Hprt1*. Pomocí Taqman sondy byly detekovány 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. Delta Ct hodnoty rozdílu exprese *B2m* a *Hprt1* v jednotlivých vzorcích byly srovnatelné v FFPE tkáni a čerstvých leukocytech.

#### **4.1.5 Porovnání vlastní a komerční Taqman sondy**

Vyšetřeny byly geny *B2m* a *Hprt1*. 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 RNA a analýzu 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 genů *B2m* a *Rplp02* ve validačním setu. Úspěšnost metody byla 95% (62/65 FFPE vzorků). Ve validačním setu byl medián výtěžku izolované RNA 11100 ng na vzorek. 78% vzorků překročilo hranici minimálního množství izolované RNA pro úspěšnou PCR, tj. 5700 ng. Všechny tyto vzorky reagovaly dobře v RTqPCR. 22% vzorků bylo pod touto hranicí. 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 ( $p = 0,086$ ).

### **4.2 Výsledky II**

Stat' výsledky II se zabývá vlivem exprese genů nenádorového stromatu na expresi sledovaných genů v nádorových buňkách.

Podle imunohistochemického barvení CD10 byly vzorky rozděleny dle kombinace positivity a negativity nádorových a stromálních buněk na čtyři skupiny, viz Tabulka 1.

Tabulka 1. Rozdělení vzorků podle CD10 positivity.

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.

CD10 pozitivní a negativní nádory (tzn. T+/S? a T-/S?) se od sebe navzájem v expresi CD10 genu signifikantně lišily ( $p < 0,001$ ). CD10 pozitivní tumory (T+/S?) vykazovali přibližně stejnou expresi mRNA CD10 bez ohledu na barvení stromatu ( $p=0,820$ ). Skupiny 1 a 2 se od sebe v expresi genu CD10 významně neliší ( $p=0,096$ ). Skupiny 2 a 3 se navzájem v expresi CD10 mRNA významně liší ( $p=0,012$ ). To znamená, že CD10 pozitivní stroma u CD10 negativního tumoru nezvyší expresi CD10 mRNA na tak velkou úroveň, jakou vykazují nádory primárně CD10 pozitivní.

### 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**

Ve skupině PMBL byla vyšší exprese genů *Fcer2* ( $p=0,002$ ) a *Pdl2* ( $p=0,002$ ), *Blk* byla více exprimována ve skupině DLBCL ( $p=0,042$ ). Diskriminační funkce vygenerovaná pomocí těchto výsledků má tvar:

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

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).

Touto rovnicí byl následně analyzován celý soubor pacientů. Celkem 10/39 očekávaných PMBL (26%) bylo po genetické analýze vyhodnoceno jako predikované DLBCL. Podobně, s původně očekávanou diagnózou DLBCL byly geneticky v diskrepanci 2/43 vzorků (5%).

Pacienti, u kterých se očekávaná klinicko-patologická a geneticky predikovaná diagnóza shodly, byli označeni jako konkordantní pacienti, ostatní jako diskordantní.

#### **4.3.2 Analýza klinických charakteristik souboru**

Jak v očekávané, tak v predikované PMBL skupině byl věkový medián nižší než u DLBCL a postiženy byly především ženy. Podbrániční postižení bylo častější v obou DLBCL skupinách ( $p=0,004$  a  $0,002$ ). PMBL pacienti obou skupin měli vstupně častější elevaci LDH ( $p=0,001$  a  $0,003$ ), infiltraci perikardu ( $p=0,001$ ), fluidothorax ( $p=0,001$ ) a častější nádorovou sklerózu ( $p=0,001$ ). Žádný z nich neměl v době diagnózy postiženu kostní dřeň.

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 ani v mezinárodním prognostickém indexu IPI. Nádorovou sklerózu jsme pozorovali u 77% očekávaných a 81% predikovaných PMBL pacientů, dále u 33% očekávaných a 37% predikovaných DLBCL.

#### **4.3.3 Diskordantní versus konkordantní PMBL pacienti**

6/82 pacientů v souboru mělo současně mediastinální bulky postižení a infiltraci sleziny, čtyři z nich 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), všichni tři byli

diskordantní ( $p=0,01$ ). 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.

#### 4.3.4 Diskordantní PMBL versus konkordantní DLBCL pacienti

Diskordantní PMBL pacienti byli 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.

#### 4.3.5 Diskordantní DLBCL pacienti

Oba dva diskordantní DLBCL pacienti byli v době analýzy výsledků v kompletní remisi, jeden 46 měsíců a druhý 40 měsíců po léčbě.

#### 4.3.6 Analýza přežití

Pacienti PMBL měli tendenci k lepší prognóze ve skupině očekávaných i predikovaných diagnóz. Ve skupině očekávaných diagnóz nebyl výsledek statisticky významný ( $p=0,179$ ), ve skupině predikovaných byl signifikantní na desetiprocentní hladině významnosti ( $p=0,084$ ). Hodnocena byla doba přežití bez progresu.

#### 4.3.7 Imunohistochemická analýza nádorových vzorků

GC/nonGC-like fenotyp nebyl v žádné z analyzovaných skupin významně odlišný. Ve skupině PMBL (očekávané i predikované) byla potvrzena vyšší četnost barvení CD23 ( $p=0,001$ ) a CD30 ( $p=0,001$ ) ve srovnání s DLBCL diagnózou.

Zastoupení fenotypů v desetičlenné skupině diskordantních PMBL pacientů je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2. Rozložení fenotypů v diskordantní PMBL skupině.

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

## 5. DISKUSE

Difuzní velkobuněčný lymfom je geneticky nehomogenní skupina nádorů, jejíž jednotlivé podjednotky GC-like, nonGC-like a PMBL se značně prognosticky liší. Z tohoto důvodu je pochopitelná snaha o co nejpřesnější odlišení jednotlivých podtypů u konkrétních pacientů. Za zlatý standard je považováno vyšetření na genových čípech (2,4). Jelikož tato metoda není pro svou technickou a finanční náročnost v praxi dostupná, jsou navrhována různá náhradní klasifikační schémata (18). Tyto náhradní algoritmy však často provází ve srovnání s čipy velká nepřesnost (18). Pro PMBL zatím žádný náhradní klasifikační algoritmus neexistuje, především pro nekonstantní pozitivitu eventuálně navrhovaných markerů (24,25,26). 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 zmrazené tkáně. Na druhé straně disponují patologická pracoviště sbírkami archivních parafinových vzorků, které jsou prakticky trvale dostupné. Poprvé byla RNA z FFPE tkáně izolována v roce 1988 (29), pro časté nesnáze při zavádění metody však v praxi příliš rozšířená není.

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 (30). V rámci izolace RNA se nejvíce osvědčil komerční kit pravděpodobně pro minimální ztráty RNA příliš častým odpipetováním supernatantu, které je běžné v jiných izolačních metodách (31). V předkládané práci nebyl potvrzen pozitivní vliv inkubace RNA v TE pufru (22). Kontrola kvality RNA spektrofotometrií je dle předkládaných výsledků vhodná, a to i přesto, že spektrofotometrické hodnoty jsou pod hranici spolehlivosti měření (0,1; Lambert-Beerův zákon). V rámci reverzní transkripcie 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 níže

exprimovanými geny. To může být při práci s FFPE zásadní problém. Fluorescenční detekce byla spolehlivější při použití TaqMan sond než při použití SYBR greenu (častá tvorba dimerů primerů v druhém případě). 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 dostatečném zastoupení nádorových buněk v řezu (80 a více procent) lze výsledky vyšetření nádorové exprese považovat za spolehlivé.

S použitím zavedené FFPE metodiky byla následně vyšetřena skupina 82 pacientů s PMBL/DLBCL diagnózou. Cílem práce bylo odlišení obou skupin na úrovni molekulárně genetické. Pro práci byly vybrány tři reprezentativní geny odlišující obě podskupiny, a to na základě světové literatury (4,19). Po vyšetření jejich exprese a statistickém zpracování výsledků byla navržena 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%, (4)) a jelikož mezi ní a předkládanou diskriminační rovnicí nepadá 100% shoda, rozpadl se původní soubor pacientů celkem do čtyř podskupin: konkordantní PMBL, diskordantní PMBL, konkordantní DLBCL a diskordantní DLBCL. Diskordantní PMBL 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 diskordantních DLBCL, tedy 5% pacientů (4). Dále diskordantní 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. 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.

IHC charakteristika PMBL tumorů je svízelná. Pro tuto diagnózu neexistují žádné exkluzivní imunohistochemické markery. 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 přístupováno 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*.

Skupina diskordantních PMBL pacientů nenesla žádný typický *GC-/nonGC/CD23/CD30* imunofenotyp, který by umožnil diferencovat ji od ostatních PMBL/DLBCL případů. Skleróza tumoru 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 eventuální možnosti porovnání různých léčebných strategií mezi skupinami PMBL/DLBCL.

## 6. ZÁVĚRY

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 transkriptáza 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 předkládaných výsledků podřadnou roli a diagnóza klinicko-patologická bývá upřednostněna.

4. Diskordantní 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. - ŠVECŮVÁ, 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. 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.
3. 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.

4. 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.

5. SAVAGE, K. J. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Oncologist*, May 2006, vol. 11, no. 5, p. 488-495.

6. VAN BESIEEN, 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.

7. 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.

8. 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.

9. LOSSOS, I.S. – MORGENZTERN, D. Prognostic biomarkers in diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, Feb 2006, vol. 24, no. 6, p. 995-1007.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

21. 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.

22. 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.

23. 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.

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. 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.

28. 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. – 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 the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium). *Journal of Clinical Pathology*, Mar 2007, vol. 25, no. 7, p. 128-138.

29. RUPP, G.M. – LOCKER, J. Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques*, Jan 1988, vol. 6, no. 1, 56-60.

30. 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, 176-82.

31. 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.

## 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. – PYLIK, 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.

15<sup>th</sup> 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

15<sup>th</sup> 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.