

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Šiklův patologicko anatomický ústav



# **Korelace morfoložických a molekulárně genetických vlastností vybraných nádorů**

Radek Šíma

Autoreferát doktorské dizertační práce

Plzeň 2010

Dizertační práce byla zpracována v rámci kombinované formy doktorského studijního programu na Šiklově patologicko-anatomickém ústavu LF UK v Plzni v letech 2006-2010.

Uchazeč: **Radek Šíma**

Šiklův patologicko anatomický ústav LF UK v Plzni

Školitel: **Prof. MUDr. Alena Skálová, CSc.**

Šiklův patologicko anatomický ústav LF UK v Plzni

Oponenti: **Doc. MUDr. Ludmila Boudová, PhD.**

Šiklův patologicko anatomický ústav LF UK v Plzni

**Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, PhD.**

Ústav histologie a embryologie LF UP v Olomouci

Stanovisko k dizertační práci vypracoval vedoucí školícího pracoviště:

**Prof. MUDr. Michal Michal**, Šiklův patologicko anatomický ústav LF UK v Plzni

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná na Šiklově patologicko-anatomickém ústavu, Dr. E. Beneše 13, Plzeň, před komisí pro obhajoby doktorských dizertačních prací v oboru patologie dne 27.4.2010 ve 14:00.

S dizertační prací je možné se seznámit na děkanátu LF UK v Plzni v Husově ulici, č.p. 13.

## **Předmluva**

Doktorská dizertační práce je shrnutím autorovy publikační činnosti v oblasti molekulární biologie nádorů a jiných onemocnění. Spis je členěn do tří částí.

První část se zabývá výskytem mutací genu CYLD u pacientů s Brooke Spieglerovým syndromem. Práce reviduje všechny doposud publikované mutace genu CYLD. Experimentální část projektu byla zaměřena na identifikaci nových zárodečných mutací genu CYLD. Dále byly studovány mnohočetné neoplázie pacientů s Brooke Spieglerovým syndromem s cílem odhalit sekundární genetické události vedoucí k tvorbě neoplázií.

Druhá část dizertační práce je věnována popisu nové jednotky nádoru slinných žlaz, tzv. sekrečního karcinomu slinných žlaz analogického karcinomu prsu, kde molekulárně biologické techniky významně přispěly k odlišení této nádorové jednotky od jakýchkoliv doposud známých nádorů slinných žlaz.

Třetí oddíl představuje souhrn dalších autorových publikací souvisejících s tématem dizertační práce. Tato část demonstruje uplatnění molekulárně biologických metod ve všech oblastech moderní patologie i dalších odvětvích medicíny.

## **Poděkování**

Rád bych na tomto místě poděkoval své školitelce Prof. MUDr. Aleně Skálové, CSc. za odborné vedení a cenné připomínky při vypracování této dizertační práce. Dále bych chtěl poděkovat všem kolegyním a kolegům ze Šiklova patologicko anatomického ústavu za možnost podílet se na řešení zajímavých výzkumných projektů. Bez nich by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

## **Prohlášení autora**

Autor souhlasí s půjčováním autoreferátu dizertační práce "**Korelace morfologických a molekulárně genetických vlastností vybraných nádorů**".

V Plzni 15.3.2010

Radek Šíma

## Obsah

<b>1. Brooke-Spieglerův syndrom: Popis nových zárodečných mutací genu CYLD...</b>	<b>5</b>
1.1. Úvod.....	5
1.1.1. Gen CYLD a jeho produkt.....	5
1.1.2. Asociace genu CYLD s lidskými genetickými onemocněními.....	5
1.2. Cíle práce.....	6
1.3. Materiál a metody.....	6
1.3.1. Detekce zárodečných mutací.....	6
1.3.2. Detekce sekundárních somatických změn.....	6
1.4. Výsledky.....	7
1.4.1. Klinickopatologická data.....	7
1.4.2. Molekulárně biologická data.....	7
1.5. Diskuze.....	10
1.6. Závěr.....	11
1.7. Summary.....	11
1.8. Seznam použité literatury.....	12
<b>2. Sekreční karcinom slinných žláz analogický karcinomu prsu nesoucí fúzní gen ETV6-NTRK3.....</b>	<b>15</b>
2.1. Úvod.....	15
2.2. Cíle práce.....	16
2.3. Materiál a metody.....	16
2.3.1. Histochemie a imunohistochemie.....	16
2.3.2. Molekulární genetika.....	16
2.3.2.1. RT-PCR.....	16
2.3.2.2. FISH.....	17
2.4. Výsledky.....	17
2.4.1. Klinická data a follow up.....	17
2.4.2. Histopatologické a imunohistochemické nálezy.....	19
2.4.3. Molekulárně genetické nálezy.....	21
2.5. Diskuze.....	22
2.6. Závěr.....	23
2.7. Summary.....	24
2.8. Literatura.....	25
<b>3. Seznam všech publikací autora dizertační práce.....</b>	<b>27</b>

# **1. Brooke-Spieglerův syndrom: Popis nových zárodečných mutací genu CYLD u 10 pacientů z 8 rodin**

## **1.1. Úvod**

### **1.1.1. Gen CYLD a jeho produkt**

Gen CYLD kóduje evolučně konzervovaný protein o velikosti 120 kDa (956 aminokyselin), který patří do proteinové rodiny DUB. Stejně jako další členové této rodiny enzymů nese protein CYLD na svém C-konci katalytickou doménu složenou ze dvou konzervovaných subdomén obsahujících aktivní cystein a aktivní histidin, které tvoří katalytickou kapsu. Protein CYLD dále obsahuje tři CAP-Gly motivy, u kterých se předpokládá, že se podílejí na vazbě k mikrotubulům (1). Přesto zůstává nejisté, zda protein CYLD interaguje s mikrotubuly přímo. Většina mutací nalézáných u genu CYLD patří do skupiny posunových, nebo nonsense mutací, které vedou ke zkrácení proteinu a vyřazení katalytické domény z funkce (2, 3). U genu CYLD bylo popsáno pouze malé množství missense mutací. Všechny, kromě jedné, postihují esenciální aminokyseliny v katalytické doméně.

### **1.1.2. Asociace genu CYLD s lidskými genetickými onemocněními**

Brooke-Spieglerův syndrom (BSS) (OMIM# 605041) je dědičné, autozomálně dominantní onemocnění charakterizované rozvojem mnohočetných adnexálních kožních neoplázií, jako jsou: spiradenomy, cylindromy, spiradenocylindromy a trichoepiteliomy (= kribriformní trichoblastomy podle poslední WHO klasifikace kožních nádorů). Penetrance onemocnění je vysoká, existují velké rozdíly v klinické prezentaci onemocnění mezi jednotlivými pacienty. Kožní léze se u pacientů začínají zpravidla objevovat v časně dospělosti a častěji se vyskytují u žen. Cylindromy se typicky vyskytují ve kšticí a mohou narůst do obřích rozměrů (tzv. turbanový tumor). Mnohočetné trichoepiteliomy bývají převážně lokalizovány na obličeji (4-7).

Kromě kůže mohou morfologicky podobné neoplázie vznikat také ve slinných žlázách, nebo jiných orgánech, ale tyto jsou extrémně vzácné (8-12). Vzácně se mohou, jinak benigní, nádory u BSS maligně změnit (13, 14).

Familiální cylindromatóza (FC) (OMIM# 132700) je vzácné dědičné nádorové onemocnění, které je charakterizované tvorbou benigních nádorů nazývaných cylindromy na vlasatých/ochlupených částech těla, převážně na hlavě (5). Předpokládá se, že cylindromy vznikají transformací folikulo-sebaceózních apokrinních jednotek, které dávají vznik vlasům (chlupům) a s nimi asociovaným žlázám.

Dalším genetickým onemocněním, které sdílí podobnosti s familiální cylindromatózou, je mnohočetný familiální trichoepiteliom (MFT) (OMIM# 601606). MFT je rovněž způsoben mutacemi genu CYLD (15-19). Mutace genu CYLD nalézáné u MFT se neliší od těch způsobujících cylindromatózu.

Je známo, že u některých pacientů s cylindromatózou se mohou rovněž vyskytovat trichoepiteliomy, benigní nádory vznikající z vlasových folikulů, a že postižení jedinci jedné rodiny mohou reprezentovat různé fenotypy se smíšenými typy nádorů (20).

## **1.2. Cíle práce**

1. nalézt nové zárodečné mutace genu CYLD u pacientů s BSS
2. prostudovat různé (mnohočetné) neoplázie od stejných pacientů a identifikovat spektrum sekundárních genetických událostí vedoucích k tvorbě neoplázií
3. revidovat všechny publikované mutace genu CYLD u BSS a příbuzných onemocnění (mnohočetné familiální trichoepiteliomy)
4. korelovat genetický nález (typ mutace) s histologickým typem nádoru

## **1.3. Materiál a metody**

### **1.3.1. Detekce zárodečných mutací**

Do studie bylo zařazeno deset pacientů s BSS pocházejících z osmi rodin. Ze dvou rodin se podařilo získat po dvou pacientkách v příbuzenském vztahu matka-dcera. K identifikaci zárodečných mutací byla u všech případů dostupná buď periferní krev, nebo nenádorová tkáň.

Analýza zárodečných mutací v exonech 1-20 genu CYLD byla provedena pomocí PCR a přímého sekvenování.

### **1.3.2. Detekce sekundárních somatických změn**

Dále bylo analyzováno 19 formalínem fixovaných, v parafínu zalitých vzorků nádorů získaných od 9 pacientů za účelem zjištění přítomnosti somatických mutací. Detekce mutací byla provedena stejným způsobem jak je uvedeno výše.

Zároveň byla u těchto vzorků provedena analýza ztrát heterozygotnosti (LOH) chromozomální oblasti 16q. LOH analýza byla provedena pomocí PCR amplifikace STR markerů D16S304, D16S308, D16S419, D16S476 a D16S541 lokalizovaných na chromozomovém raménku 16q a markeru D16S407 lokalizovaného na chromozomovém raménku 16p a fragmentační analýzy.

Vzorek byl považován za LOH pozitivní, pokud byl poměr intenzity signálů dvou alel u vzorku nádorové tkáně dělený poměrem intenzity signálů dvou alel u vzorku zdravé tkáně  $>2$ , nebo  $<0,5$ .

Všechny nalezené mutace (zárodečné i somatické), resp. LOH byly potvrzeny dvojitým opakováním zahrnujícím novou izolaci DNA, PCR a sekvenování, resp. LOH analýzu.

K vyloučení možnosti, že abnormality genu CYLD by mohli představovat polymorfismy (benigní mutace) spíše než mutace asociované se vznikem nádorů (maligní mutace), byly stejným způsobem otestovány vzorky DNA z periferní krve od 110 náhodně vybraných, zdravých, nepříbuzných jedinců.

U jednoho případu (Případ 5) (viz výsledky) byla provedena predikce vlivu mutace na funkci proteinu za použití PolyPhen software.

Jeden případ (Případ 8) byl již dříve publikován, ovšem bez molekulárně biologických dat (22).

Za použití databáze PubMed a křížových odkazů v jednotlivých člancích byly zrevidovány všechny publikace pojednávající o zárodečných a/nebo somatických mutacích genu CYLD u BSS.

## **1.4. Výsledky**

### **1.4.1. Klinickopatologická data**

Soubor pacientů se skládal z osmi žen a dvou mužů ve věku od 22 do 66 let (Tabulka 1.1). Všichni pacienti byli postiženi mnohočetnými, různě velkými papulami a uzlíky lokalizovanými především v pokožce hlavy. K histopatologickému prozkoumání bylo k dispozici celkem 38 nádorů ve složení 16 cylindromů, 11 spiradenomů, 7 spiradenocylindromů a 4 trichoepiteliomy (kribriformní trichoblastomy). Navíc, malá trichoblastomatózní ohniska byla identifikována u 1 z 11 spiradenomů a u 2 ze 16 cylindromů.

### **1.4.2. Molekulárně biologická data**

V souboru pacientů bylo nalezeno osm nových, dříve nepopsaných zárodečných mutací (Tabulka 1.1). Sekvenováním DNA od 110 náhodně vybraných, zdravých, nepříbuzných jedinců nebyla nalezena žádná z těchto sekvenčních variant.

Dále bylo analyzováno celkem 19 formalínem fixovaných, v parafínu zalitých vzorků nádorových tkání získaných od 9 pacientů. U devíti z nich byly odhaleny somatické sekvenční mutace, u zbývajících deseti byl prokázán LOH (Tabulka 1.1). U Případu 5 nebylo možné analýzu provést z důvodu silného poškození DNA formalínovou fixací.

Zjištěné mutace (zárodečné i somatické) byly substituce, delece, inserce a duplikace. Všechny kromě jedné vedly ke vzniku předčasného stop-kodonu (Tabulka 1.1). Případ s aminokyselinovou substitucí (Případ 5) byl analyzován pomocí PolyPhen softwaru, který předpověděl pravděpodobný škodlivý efekt této mutace na strukturu a funkci proteinu. U případů u kterých byl detekován LOH byla zároveň přítomna hemizygotní zárodečná sekvenční mutace.

U čtyřech případech (Případy 1, 2, 7, 9) byly nalezeny u různých nádorů téhož pacienta různé somatické mutace (Tabulka 1.1). U Případu 1 nesl každý ze tří spiradenocylindromů různou somatickou mutaci (změnu). U prvního byl prokázán LOH, druhý nesl duplikaci a u třetího byla nalezena substituce. U Případu 2 byl u jednoho spiradenocylindromu prokázán LOH a u druhého duplikace. U případu 7 byla

u jednoho cylindromu nalezena substituce, u druhého byla odhalena inserce. U případu 9 byl u dvou ze tří cylindromů nalezen LOH, kdežto u třetího byla prokázána substituce. Ve všech těchto případech vedla sekvenční somatická mutace ke zkrácenému proteinu.



**Tabulka 1.1.** Hlavní klinicko patologické údaje a výsledky molekulárně biologických studií u pacientů s Brooke-Spieglerovým syndromem

Případy	Pohlaví Věk	Klinický projev	Nádory dostupné k histologickému vyšetření	Nádory dostupné ke genetickému vyšetření	zárodečná mutace		somatická mutace (změna)	
					c.DNA	Protein	c.DNA	Protein
Případ 1	Ž/69	Více než 50 nádorů vyskytujících se na celém povrchu těla	3 spiradenocylindromy	SC SC SC	1455T>G 1455T>G 1455T>G	Y485X* Y485X* Y485X*	1736_1739dupTGGA LOH 1794C>A	E580DfsX36  Y598X
Případ 2	Ž/37	Více než 20 nádorů vyskytujících se ve kštici, na krku a v pubické oblasti	2 spiradenocylindromy 1 cylindrom	C SC SC	1455T>G 1455T>G 1455T>G	Y485X* Y485X* Y485X*	LOH LOH 1540dupA	  T514NfsX29
Případ 3	Ž/42	Více než 20 nádorů ve kštici	3 cylindromy	C	2104delA	I702X	1112C>A	S371X
Případ 4	Ž/22	Mnohočetné nádory ve kštici	1 cylindrom	C	2104delA	I702X	2467C>T	Q823X
Případ 5	M/34	Mnohočetné, 1 až 2 cm velké nádory ve kštici, na trupu a vnějším zvukovodu, některé léze bolestivé	2 cylindromy 1 trichoepiteliom	NA	2108G>C	R703T	NA	NA
Případ 6	Ž/67	Mnohočetné nádory ve kštici, na trupu a končetinách přítomné po mnoho let	3 cylindromy 1 trichoepiteliom 2 spiradenomy	C S S	2119C>T 2119C>T 2119C>T	Q707X Q707X Q707X	2806C>T LOH LOH	R936X
Případ 7	Ž/66	Mnohočetné nádory ve kštici, první léze se objevila ve 46 letech	2 cylindromy 1 spiradenom	C C	2170_2171insTC 2170_2171insTC	K724ifsX12 K724ifsX12	2713C>T 2046_2047insAGATCCG	Q905X E683RfsX43
Případ 8	Ž/44	Mnohočetné velké nádory na čele, ve kštici, na obličeji, uších, horních končetinách a hrudi, první léze se objevila v 18 letech	8 spiradenomů 2 trichoepiteliomy	S	2299A>T	K767X	LOH	
Případ 9	Ž/63	Mnohočetné nádory ve kštici	4 cylindromy	C C C	2729dupC 2729dupC 2729dupC	E911RfsX31 E911RfsX31 E911RfsX31	LOH 2107A>T LOH	R703X
Případ 10	M/47	Mnohočetné papuly a nádory ve kštici	2 spiradenocylindromy	SC SC	2814_2817delGCTT 2814_2817delGCTT	L939VfsX13 L939VfsX13	LOH LOH	

Případy 1 a 2 jsou v příbuzenském vztahu matka - dcera, stejně tak i případy 3 a 4.

Mutace na úrovni proteinu je odvozena od isoformy 1 mRNA.

\* Tato mutace je známá na proteinové úrovni, ale zde je důsledkem jiné nukleotidové záměny, než dříve publikovaná mutace (2).

**Vysvětlivky:** C cylindrom, LOH loss of heterozygosity (ztráta heterozygotnosti), M muž, NA nelze analyzovat, S spiradenom, SC spiradenocylindrom, Ž žena

## 1.5. Diskuze

Mutace genu CYLD bývají spojovány s FC, MFT a BSS. Gen CYLD je tvořen dvaceti exony, z nichž první tři nejsou translatovány. Exony 3 a 7 podléhají alternativnímu splicingu (5). Gen kóduje cytoplasmatický deubiquitační protein, který reguluje několik signálních drah. Protein je složen ze tří CAP-GLY (cytoskeletal-associated protein-glycine-conserved) domén, NEMO a TRAF-2 vazebných domén, fosforylační domény a katalytické domény (23, 24).

Tato studie přináší informace o osmi nových zárodečných mutacích genu CYLD u pacientů s BSS, čímž je rozšířen seznam známých zárodečných mutací genu CYLD na 66. Všechny nalezené mutace, kromě jedné, vedou k vytvoření předčasného stop-kodonu a tedy ke zkrácení proteinu, což je nejčastější typ mutací nalézáných u genu CYLD (3, 21, 25, 26). Substituční mutace u případu 5 byla analyzována pomocí Polyphen softwaru za účelem zjištění, zda tato záměna skutečně představuje mutaci spojenou se vznikem nádoru. Tato analýza, společně s výsledky sekvenování u 110 zdravých, nepříbuzných jedinců, prokázala kauzální roli této mutace pro vznik nádoru.

V souladu s Knudsonovou teorií vyžaduje tumor supresorový gen dva zásahy (29), aby byl inaktivován a došlo ke vzniku nádoru. Ačkoliv první zásahy – zárodečné mutace – byly u BSS a příbuzných lézí hojně studovány, druhé zásahy – somatické změny – byly analyzovány pouze vzácně a informace o spektru somatických změn u různých neoplázií stejného pacienta jsou prakticky neznámé. Pouze několik málo badatelů analyzovalo jeden nádor u jednoho pacienta a identifikovalo LOH, nebo mutaci (4, 5, 16, 27).

V této studii byla testována pomocí sekvenování a LOH analýzy série 19 nádorů od 9 pacientů. Analýza somatických mutací přinesla několik zajímavých nálezů. Za prvé, druhý zásah může být u BSS reprezentován buď LOH, nebo mutacemi vedoucími ke změně v nukleotidové sekvenci. Za druhé, mnohočetné nádory stejného histologického typu (např. cylindromy) mohou mít u stejného pacienta různé somatické mutace (Případy 1, 2, 7, 9, Tabulka 1.1). Tyto nálezy naznačují, že mnohočetné nádory u jednotlivých pacientů s BSS vznikají nezávisle, samostatnou somatickou změnou (druhým zásahem) genu CYLD. Pokud je nám známo, naše práce představuje první popis tohoto fenoménu u genu CYLD.

Z morfologického hlediska naše studie potvrdila dříve publikované práce popisující výskyt různých typů adnexálních nádorů u BSS. Ačkoliv původně byly u pacientů s BSS popisovány cylindromy a obličejové trichoepiteliomy, do dnešních dnů byly u těchto pacientů nalezeny i další typy nádorů, jakými jsou např. spiradenomy, spiradenocylindromy a jejich maligní analogy (6, 22, 28).

I když jsme neprováděli přesnou statistickou analýzu, je z našich dat evidentní, že zde není žádná korelace genotypu a fenotypu ve smyslu, že jednotlivé typy nádorů nejsou spojeny s nálezem specifické zárodečné, nebo somatické změny (mutace), což je v souladu s dříve publikovanými daty.

## 1.6. Závěr

Bylo identifikováno 8 nových zárodečných mutací (substituce, delece a inserce/duplikace), z nichž všechny, kromě jedné, vedly ke vzniku předčasného stop-kodonu. V jednom případě byla nalezena substituční mutace, která nevedla k předčasnému stop-kodonu, ale bylo předpovězeno, že rovněž vede k poruše funkce proteinu a je tedy kauzální pro vznik nádoru.

Jako první jsme demonstrovali, že somatické změny (LOH, nebo sekvenční mutace) se mohou lišit mezi mnohočetnými nádory vyskytujícími se u jednoho pacienta. A to i v případě, že jsou stejného histologického typu.

Výsledky této studie byly použity k přípravě publikace přijaté do tisku v *Diagnostic Molecular Pathology* (Sima R., Vanecek T., Kacerovska D., Trubac P., Cribier B., Rutten A., Vazmitel M., Spagnolo DV., Litvik R., Vantuchova Y., Wyers W., Pearce RL., Pearn J., Michal M., Kazakov DV., Brooke-Spiegler syndrome: report of 10 patients from 8 families with novel germline mutations. Evidence of diverse somatic mutations in the same patient regardless of tumor type.).

## 1.7. Summary

Brooke-Spiegler syndrome (BSS) is an inherited autosomal dominant disease characterized by the development of multiple adnexal cutaneous neoplasms including spiradenoma, cylindroma, spiradenocylindroma and trichoepithelioma (cribriform trichoblastoma). BSS patients have various mutations in the *CYLD* gene, a tumor suppressor gene located on chromosome 16q. Our search of the literature revealed 52 germline *CYLD* gene mutations reported to date. Somatic *CYLD* mutations have rarely been investigated. We studied ten patients from 8 families with BSS. Analysis of germline mutations of the *CYLD* gene was performed using either peripheral blood or nontumorous tissue. Additionally, 19 formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples were analyzed for somatic mutations, including loss of heterozygosity (LOH) studies. A total of 38 tumors were available for histopathological review. We have identified 8 novel germline mutations, all of which consisted of substitutions, deletions and insertions/duplications and all except one led to premature stop codons. The substitution mutation in a single case was also predicted to disrupt protein function and seems causally implicated in tumor formation. We demonstrate for the first time that somatic events, LOH or sequence mutations, may differ among multiple neoplasms even of the same histological type, occurring in the same patient.

## 1.8. Seznam použité literatury

1. Riehemann K, Sorg C. Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *Trends Biochem Sci.* 1993 Mar;18(3):82-3.
2. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6831-43.
3. Almeida S, Maillard C, Itin P, Hohl D, Huber M. Five new CYLD mutations in skin appendage tumors and evidence that aspartic acid 681 in CYLD is essential for deubiquitinase activity. *J Invest Dermatol.* 2008 Mar;128(3):587-93.
4. Leonard N, Chaggar R, Jones C, Takahashi M, Nikitopoulou A, Lakhani SR. Loss of heterozygosity at cylindromatosis gene locus, CYLD, in sporadic skin adnexal tumours. *J Clin Pathol.* 2001 Sep;54(9):689-92.
5. Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, Green H, Brown C, Biggs PJ, Lakhani SR, Jones C, Hansen J, Blair E, Hofmann B, Siebert R, Turner G, Evans DG, Schrandner-Stumpel C, Beemer FA, van Den Ouweland A, Halley D, Delpech B, Cleveland MG, Leigh I, Leisti J, Rasmussen S. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):160-5.
6. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin AE. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press: Lyon 2006. 2006.
7. Kazakov DV, Soukup R, Mukensnabl P, Boudova L, Michal M. Brooke-Spiegler syndrome: report of a case with combined lesions containing cylindromatous, spiradenomatous, trichoblastomatous, and sebaceous differentiation. *Am J Dermatopathol.* 2005 Feb;27(1):27-33.
8. Pingitore R, Campani D. Salivary gland involvement in a case of dermal eccrine cylindroma of the scalp (turban tumor). Report of a case with lung metastases. *Tumori.* 1984 Aug 31;70(4):385-8.
9. Rockerbie N, Solomon AR, Woo TY, Beals TF, Ellis CN. Malignant dermal cylindroma in a patient with multiple dermal cylindromas, trichoepitheliomas, and bilateral dermal analogue tumors of the parotid gland. *Am J Dermatopathol.* 1989 Aug;11(4):353-9.
10. Antonescu CR, Terzakis JA. Multiple malignant cylindromas of skin in association with basal cell adenocarcinoma with adenoid cystic features of minor salivary gland. *J Cutan Pathol.* 1997 Aug;24(7):449-53.
11. Kostler E, Schonlebe J, Mentzel T, Haroske G, Wollina U. Psoriasis and Brooke-Spiegler syndrome with multiple malignancies. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005 May;19(3):380-1.
12. Nonaka D, Rosai J, Spagnolo D, Fiaccavento S, Bisceglia M. Cylindroma of the breast of skin adnexal type: a study of 4 cases. *Am J Surg Pathol.* 2004 Aug;28(8):1070-5.

13. Argenyi ZB, Nguyen AV, Balogh K, Sears JK, Whitaker DC. Malignant eccrine spiradenoma. A clinicopathologic study. *Am J Dermatopathol.* 1992 Oct;14(5):381-90.
14. Kazakov DV, Zelger B, Rütten A, Vazmitel M, Spagnolo DV, Kacerovska D, Vanecek T, Grossmann P, Sima R, Grayson W, Calonje E, Koren J, Mukensnabl P, Danis D, Michal M. Morphologic diversity of malignant neoplasms arising in preexisting spiradenoma, cylindroma and spiradenocylindroma based on the study of 24 cases, sporadic or occurring in the setting of Brooke-Spiegler syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2009 May;33(5):705-19.
15. Espana A, Garcia-Amigot F, Aguado L, Garcia-Foncillas J. A novel missense mutation in the CYLD gene in a Spanish family with multiple familial trichoepithelioma. *Arch Dermatol.* 2007 Sep;143(9):1209-10.
16. Salhi A, Bornholdt D, Oeffner F, Malik S, Heid E, Happle R, Grzeschik KH. Multiple familial trichoepithelioma caused by mutations in the cylindromatosis tumor suppressor gene. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5113-7.
17. Zheng G, Hu L, Huang W, et al. CYLD mutation causes multiple familial trichoepithelioma in three Chinese families. *Hum Mutat* 2004;23:400.
18. Zuo YG, Xu Y, Wang B, Liu YH, Qu T, Fang K, Ho MG. A novel mutation of CYLD in a Chinese family with multiple familial trichoepithelioma and no CYLD protein expression in the tumour tissue. *Br J Dermatol.* 2007 Oct;157(4):818-21.
19. Zhang XJ, Liang YH, He PP, Yang S, Wang HY, Chen JJ, Yuan WT, Xu SJ, Cui Y, Huang W. Identification of the cylindromatosis tumor-suppressor gene responsible for multiple familial trichoepithelioma. *J Invest Dermatol.* 2004 Mar;122(3):658-64.
20. Poblete Gutiérrez P, Eggermann T, Höller D, Jugert FK, Beermann T, Grussendorf-Conen EI, Zerres K, Merk HF, Frank J. Phenotype diversity in familial cylindromatosis: a frameshift mutation in the tumor suppressor gene CYLD underlies different tumors of skin appendages. *J Invest Dermatol.* 2002 Aug;119(2):527-31.
21. Liang YH, Sun CS, Ye XY, Zhang W, Yang S, Zhang XJ. Novel substitution and frameshift mutations of CYLD in two Chinese families with multiple familial trichoepithelioma. *Br J Dermatol.* 2008 May;158(5):1156-8.
22. Weyers W, Nilles M, Eckert F, Schill WB. Spiradenomas in Brooke-Spiegler syndrome. *Am J Dermatopathol.* 1993 Apr;15(2):156-61.
23. Massoumi R, Paus R. Cylindromatosis and the CYLD gene: new lessons on the molecular principles of epithelial growth control. *Bioessays.* 2007 Dec;29(12):1203-14.
24. Courtois G. Tumor suppressor CYLD: negative regulation of NF-kappaB signaling and more. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Apr;65(7-8):1123-32.

25. Saggar S, Chernoff KA, Lodha S, Horev L, Kohl S, Honjo RS, Brandt HR, Hartmann K, Celebi JT. CYLD mutations in familial skin appendage tumours. *J Med Genet*. 2008 May;45(5):298-302.
26. Zhang G, Huang Y, Yan K, Li W, Fan X, Liang Y, Sun L, Li H, Zhang S, Gao M, Du W, Yang S, Liu J, Zhang X. Diverse phenotype of Brooke-Spiegler syndrome associated with a nonsense mutation in the CYLD tumor suppressor gene. *Exp Dermatol*. 2006 Dec;15(12):966-70.
27. Heinritz W, Grunewald S, Strenge S, Schütz A, Froster UG, Glander HJ, Paasch U, Simon JC. A case of Brooke-Spiegler syndrome with a new mutation in the CYLD gene. *Br J Dermatol*. 2006 May;154(5):992-4.
28. Kazakov DV, Thoma-Uszynski S, Vanecek T, Kacerovska D, Grossmann P, Michal M. A case of Brooke-Spiegler syndrome with a novel germline deep intronic mutation in the CYLD gene leading to intronic exonization, diverse somatic mutations and unusual histology. *Am J Dermatopathol*. 2009 Aug 7. [Epub ahead of print]
29. Knudson AG, Jr. Introduction to the genetics of primary renal tumors in children. *Med Pediatr Oncol*. 1993;21(3):193-8.

## **2. Sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu nesoucí fúzní gen ETV6-NTRK3. Doposud nepopsaná jednotka nádoru slinných žlaz**

### **2.1. Úvod**

Sekreční karcinom, známý také jako juvenilní karcinom prsu, je vzácnou variantou duktálního karcinomu prsu, původně popsaného McDivitem a Stewartem u pacientů ve věku 3-15 let (11). Histologicky je sekreční karcinom tvořen ohraničenými noduly složenými z uniformních neoplastických epiteliálních buněk uspořádaných do mikrocystických, tubulárních a solidních růstových struktur. Nádorové buňky mají *low-grade* jádra s vesikulárním chromatinem a objemnou, světle růžovou, granulární, nebo vakuolizovanou cytoplasmu. V mikrocystických a tubulárních prostorech je přítomna hojná, pěnitá sekrece. Imunohistochemicky jsou sekreční karcinomy často negativní v reakci s protilátkami proti estrogenovým a progesteronovým receptorům a proti HER-2/neu a jsou často pozitivní s protilátkami proti proteinu S-100, EGFR a vimentinu (4).

Acinický karcinom prsu (AciCC) byl poprvé popsán skupinou Roncaroli a kol. v roce 1996 (13). Histologicky je AciCC prsu složen z buněk uspořádaných do mikrocystických, solidních a mikroglandulárních struktur podobajících se AciCC slinných žlaz a mamární mikroglandulární adenóze (3). V nedávné studii popsali Hirokawa a kol. (8) podobnost imunohistochemických a klinickopatologických znaků pozorovaných u sekrečního karcinomu prsu a AciCC slinných žlaz. Na základě těchto nálezů vyslovili hypotézu, že sekreční karcinom prsu a AciCC slinných žlaz mohou být identickými jednotkami.

V nedávné době bylo prokázáno, že sekreční karcinom prsu nese balancovanou chromozomální translokaci t(12;15)(p13;q25), která vede ke vzniku fúzního produktu složeného z genu ETV6 ležícího na chromozomu 12 a genu NTRK3 ležícího na chromozomu 15 (14). Fúzní gen ETV6-NTRK3 kóduje chimerickou tyrozin kinázu, u které byla prokázána transformační aktivita v epiteliálních a myoepiteliálních buňkách myší mléčné žlázy (10). Tato translokace se zdá být mezi prsními nádory specifická pouze pro sekreční karcinom.

V průběhu naší konzultační praxe jsme narazili na zvláštní, doposud neznámý karcinom slinných žlaz charakterizovaný morfologickými a imunohistochemickými vlastnostmi připomínajícími sekreční karcinom prsu. Z našeho archivu nádorů slinných žlaz jsme získali celkem 16 případů, které byly dříve klasifikovány jako: neobvyklá varianta AciCC slinných žlaz, nebo jako blíže nespecifikovaný cystadenokarcinom. Nádory jsou tvořeny mikrocystickými a solidními oblastmi s hojným, vakuolizovaným, koloidním, PAS-pozitivním sekrečním materiálem vyplňujícím mikrocystické prostory. Navrhujeme pro tuto skupinu nádorů označení sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu (Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands = MASC).

## 2.2. Cíle práce

1. prostudovat přítomnost translokace t(12;15)(p13;q25) ETV-NTRK3 u souboru nádorů slinných žlaz se sekreční morfologií (14 případů), prsních sekrečních karcinomů (3 případy) a u 16 případů MASC
2. zjistit, zda jsou MASC a AcicC odlišnými jednotkami
3. pokud ano, navrhnout jejich samostatné zařazení v klasifikaci salivárních nádorů

## 2.3. Materiál a metody

Soubor byl tvořen 16 případy neobvyklého karcinomu slinných žlaz morfologicky připomínajícího sekreční karcinom prsu. Za účelem porovnání bylo do histologické a imunohistochemické studie zařazeno dalších 30 případů nádorů slinných žlaz se sekrečními rysy, zahrnujících AcicC (12 případů), *low grade* a *high grade* mukoepidermoidní karcinom (6 případů), adenoidní cystický karcinom (4 případy), *low grade* kribriformní cystadenokarcinom (1 případ), salivární duktální karcinom (2 případy), adenokarcinom blíže nespecifikovaný (3 případy) a pleomorfní adenom (2 případy).

Molekulárně biologicky byly, kromě studovaných případů MASC, analyzovány také 3 případy sekrečního karcinomu prsu jako pozitivní kontroly, 14 případů nádorů slinných žlaz se sekreční morfologií a 10 případů normálních, nenádorových tkání slinných žlaz.

### 2.3.1. Histochemie a imunohistochemie

Tkáň byla fixována ve formalínu, rutinně zpracována, zalita do parafínu, nakrájena a obarvena hematoxylinem – eosínem. Ve většině případů byla provedena také další barvení, včetně PAS barvení s diastázou i bez, barvení mucikarmínem a *alcian blue* při pH 2,5. U 15 případů MASC byly k dispozici parafínové bločky k imunohistochemickému vyšetření.

### 2.3.2. Molekulární genetik

#### 2.3.2.1. RT-PCR

RNA z formalínem fixovaných, v parafínu zalitých tkání byla izolována pomocí RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA). cDNA byla syntetizována za použití First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Všechny kroky byly provedeny přesně podle protokolů výrobců. Ke kontrole kvality extrahované RNA byla použita PCR amplifikace 105 bp fragmentu transkriptu genu kódujícího  $\beta$ 2-mikroglobulinu, 126 bp fragmentu transkriptu genu kódujícího PBGD a 247 bp fragmentu transkriptu genu kódujícího PGK (1, 7, 15).

Detekce 110 bp velkého fragmentu fúzního transkriptu ETV6-NTRK3 byla provedena podle metodiky popsané skupinou Burgeois a kol. (2).



### 2.3.2.2. FISH

Detekce translokace zahrnující gen ETV6 byla dále potvrzována metodou FISH za použití sondy LSI ETV6 (TEL) (12p13) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (VYSIS/Abbott).

Vyhodnocení bylo provedeno spočítáním fluorescenčních signálů ve 100 náhodně vybraných, nepřekrývajících se jader nádorových buněk. Skla byla nezávisle vyhodnocena dvěma pozorovateli. Hodnoty *cut-off* byly stanoveny spočtením 100 nepřekrývajících se jader u 10 případů normálních, nenádorových, kontrolních tkání slinných žlaz. Průměrný počet rozdělených (translokovaných) signálů byl u normální, kontrolní tkáně 2,34% a standardní odchylka (SD) 1,83. Vzorky byly klasifikovány jako pozitivní, pokud více než 10% (průměr + 3 SD, zaokrouhлено nahoru) jader neslo rozdělený (translokovaný) signál.

## 2.4. Výsledky

### 2.4.1. Klinická data a *follow up*

Nejdůležitější klinická data a makroskopické vlastnosti všech 16 případů MASC jsou shrnuty v Tabulce 2.1. Průměrný věk pacientů byl 46 let (rozmezí od 21 do 75 let). Z 16 případů MASC se 9 vyskytlo u mužů a zbývajících 7 u žen. U jednoho pacienta byl tumor lokalizován v malých slinných žlázách bukální sliznice, jeden měl nádor patra, další měl nádor horního rtu, u ostatních 13 případů se nádor vyskytl v příušní žláze. Průměrná velikost nádorů byla 2,1 cm (rozmezí od 0,7 do 5,5 cm). Původní diagnózy zahrnovaly AciCC, adenoidní cystický karcinom, cystadenokarcinom a nízce maligní karcinom blíže nespecifikovaný. Trvání symptomů bylo zaznamenáváno u 14 případů a pohybovalo se v rozmezí od dvou měsíců do třiceti let. 7 pacientů popsalo svoje léze jako pomalu rostoucí noduly přítomné po mnoho let. U 3 pacientů byl zaznamenán rychlý růst nádorů. U 2 pacientů se vyskytl multinodulární tumor a mnohočetné recidivy izolovaných nádorových nodulů. U 1 případu byl nádor cystický a zvětšoval se pomalu (Tabulka 2.1).

**Tabulka 2.1.** Sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu (MASC): Důležitá klinická data

Případ	Věk/ Pohlaví	Lokalizace	Velikost (mm)	Trvání symptomů před operací	Klinický projev	Stage v čase diagnózy	Léčba	Follow-up
1	51/Ž	Ústní sliznice	10	1 rok	Pomalu rostoucí, nebolestivý uzlík	T1N0M0	NRE	NED,4 roky
2	44/Ž	Příušnice	9x8x8	3 měsíce	Multinodulární nádor	T2N0M0	NRE	NED, 6 let
3	48/M	Měkké patro	10x15	NA	Pomalu rostoucí uzlík	T1N0M0	NRE	NED,9 let
4	55/M	Příušnice	55x45x30	2 měsíce	Rychlý růst	T4N2M0	RP/RT	ME 2 roky, DOD 2 roky
5	34/M	Příušnice	16	1 rok	Dobře ohraničený uzlík	T1N0M0	NRE	NED,7 let
6	53/M	Příušnice	15	NA	Recidivující nádor s extraglandulární extenzí	T3N0M0	CP	RE,6 let
7	53/M	Příušnice	35	1,5 roku	Nebolestivý uzlík tvrdé konzistence fixovaný k přilehlé tkáni, extraglandulární extenze, 60 × 40 mm	T3N0M0	CP/RT	RE, 2 roky,3 roky DOD,6 let
8	55/Ž	Příušnice	10	30 let	Mnohočetné recidivy izolovaných nádorových uzlíků	T1N0M0	NRE, RP/RT	Mnohočetná RE, NED,3 roky
9	26/M	Příušnice	15	14 let	Nádor levé příušnice rozšířený do pokožky obličeje	T3N0M0	RP/RT	RE 6 měsíců, NED 22 měsíců
10	35/Ž	Příušnice	30x25x20	NA	Cystický, nebolestivý, pomalu se zvětšující nádor	T1N0M0	NRE/RT	NED,9 let
11	46/M	Příušnice	14	26 let	Nebolestivý, neohraničený, bílý nádor, dlouhá přítomnost nebolestivého uzlíku	T1N0M0	CP/RT	NED,10 let
12	55/M	Příušnice	40	23 let	Nebolestivý, neohraničený, bílý nádor, rostoucí posledních 6 měsíců	T2N0M0	RP	NED,3 roky
13	59/Ž	Příušnice	NA	14 let	Tuhý, nebolestivý nádor	NA	NRE	Nebyl k dispozici
14	21/Ž	Příušnice	27	NA	Nebolestivý uzlík	T2N0M0	NRE	NED nový případ
15	75/Ž	Příušnice	7	NA	Nebolestivý uzlík	T1N0M0	NRE	NED nový případ
16	32/M	Horní ret	10	Několik měsíců	Nebolestivý, ale zvětšující se uzlík	T1N0M0	NRE, re- excize, RT/ND	LN ME 86 měsíců, NED 27 měsíců

**Vysvětlivky:** Ž žena, M muž, NRE neradikální odstranění nádoru, RP radikální parotidektomie, CP konzervativní parotidektomie, RT radioterapie, ND – bloková krční disekce, NED bez známek onemocnění, DOD smrt následkem onemocnění, NA není k dispozici, ME metastáza, RE recidiva, LN lymfatická uzlina

#### 2.4.2. Histopatologické a imunohistochemické nálezy

Nádory byly z makroskopického pohledu pružné konzistence, na řezu bělavé až šedé. Histologicky představovaly všechny případy ohraničenou, laločnatou masu rozdělenou fibrózními septy a složenou z mikrocystických, tubulárních a solidních struktur. Okraje nádorů byly obvykle ohraničené, ale nezapouzdřené a často byl přítomen invazivní růst do slinné žlázy. U 4 případů se tumor šířil i do okolních tkání mimo slinnou žlázu. Nádorové buňky měly *low grade* vesikulární jádra s jemně zrnitým chromatinem, výrazná, centrálně lokalizovaná jádérka a světle růžovou, granulární, nebo vakuolizovanou cytoplasmu. Buněčné atypie byly mírné a mitotické figury byly ve většině případů vzácné. Nebyl nalezen žádný důkaz perineurální, nebo vaskulární invaze, nebyla přítomna ani nekróza. Oproti AcicCC nebyla u žádného případu pozorována serózní acinární diferenciaci. V mikrocystických a tubulárních prostorech byla přítomna hojná bublinkovitá sekrece. Sekreční materiál byl PAS pozitivní a to jak s natrávením diastázou, tak i bez. Dále byl pozitivní v barvení mucikarminem, MUC1 (11 z 12 vyšetřených případů) a MUC4 (8 z 12 vyšetřených případů).

Histochemické a imunohistochemické profily všech 16 nádorů jsou shrnuty v Tabulce 2.2. Všechny případy MASC se barvily silně s protilátkami proti CK7, CK8, CK18, S-100 proteinu a vimentinu. Dále byla většina případů signifikantně pozitivních s protilátkami proti CK19 (11 z 12 vyšetřených případů), GCDFP-15 (8 z 11 vyšetřených případů) a EMA (9 z 11 vyšetřených případů). Nádorové buňky rovněž vykazovaly ve všech případech silnou expresi STAT5a a mammaglobinu. Markery bazálních a myoepiteliálních buněk, jako např. p63, calponin, CK14, aktin hladké svaloviny a CK5/6 byly negativní. Proliferační aktivita byla variabilní s MIB1 indexy v rozmezí 5-28%.

**Tabulka 2.2.** Výsledky imunohistochemických studií

IHC marker	MASC Počet případů: 15	SC prsu (Pozitivní kontroly) Počet případů: 4	Konvenční AciCC, (Negativní kontroly) Počet případů: 12
S-100 protein	15/15	4/4	4/12
Vimentin	15/15	4/4	3/12
CK7	15/15	4/4	8/9
CK8	15/15	4/4	2/10
CK19	15/15	2/4	2/10
CK18	15/15	4/4	9/10
GCDFP-15	8/11	3/4	4/10
Mammaglobin	15/15	4/4	1/11
STAT 5a	15/15	4/4	7/11
MUC1	11/12	4/4	6/8
MUC4	9/11	4/4	0/8
EMA	9/9	4/4	NT
Ki-67	5-28%	5-10%	5-50%
P63	0/9*	0/4*	0/6
Calponin	0/9	0/4	0/6
EGFR	0/9	0/4	0/6
c-erbB-2	0/9	0/4	0/6
ER	0/9	0/4	0/6
PR	0/9	0/4	0/6
AR	0/9	1/4	0/6

\*buňky byly imunohistochemicky negativní, ale sekretorický materiál se barvil silně pozitivně

**Vysvětlivky:** NT – nebylo testováno, IHC – imunohistochemický, SC – sekreční karcinom, MASC – sekreční karcinom slinných žláz analogický karcinomu prsu, AciCC – acinický karcinom

### 2.4.3. Molekulárně genetické nálezy

16 vzorků MASC od 15 pacientů bylo analyzováno pomocí RT-PCR. Ve 14 případech byla kvalita extrahované RNA dostatečná pro následné zjišťování přítomnosti fúzního genu ETV6-NTRK3 (tzn. amplifikovaly se alespoň dva kontrolní geny). Přítomnost fúzního transkriptu ETV6-NTRK3 byla potvrzena u 13 případů MASC (Tabulka 2.3) a u všech tří pozitivních kontrol (sekreční karcinom prsu). Příklad 8 byl negativní (Tabulka 2.3). U žádné z negativních kontrol (různé nádory slinných žlaz se sekreční morfologií a normální, nenádorové kontroly) nebyla prokázána přítomnost translokace genu ETV6.

Translokace zahrnující gen ETV6 byla potvrzena metodou FISH za použití sondy LSI ETV6 (TEL) (12p13) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (VYSIS/Abbott) u všech 11 analyzovatelných případů MASC a u všech pozitivních kontrol. Zlom genu ETV6 nebyl detekován u žádného ze 14 případů nádorů slinných žlaz se sekreční morfologií, ani u 10 normálních, nenádorových kontrol.

**Tabulka 2.3.** Výsledky molekulárně genetických studií MASC

		Kontrolní geny			fúzní gen	FISH	Souhrn
		β2M	PBGD	PGK	ETV6-NTRK3	zlom ETV6	
51/Ž	Případ 1	+	+	-	+	NA	+
44/Ž	Případ 2	+	+	-	+	NA	+
48/M	Případ 3	+f	-	-	NA	+	+
		+	+	-	+	+	+
55/M	Případ 4	+	+	+	+	+	+
34/M	Případ 5	+	+	-	+	NA	+
53/M	Případ 6	+	+	+	+	+	+
53/M	Případ 7	+	+	-	+	+	+
55/Ž	Případ 8	+	+	+	-	NA	-
26/M	Případ 9	+	+	+	+	+	+
35/Ž	Případ 10	+f	-	-	NA	NA	NA
46/M	Případ 11	+	+	+	+	+	+
55/M	Případ 12	+	+	+	+	+	+
59/Ž	Případ 13	NT	NT	NT	NT	NT	NT
21/Ž	Případ 14	+	+	+	+	+	+
75/Ž	Případ 15	+	+	+	+	+	+
32/M	Případ 16	+	+	+	+	+	+

Vzorky byly uznány za translokované, pokud buď RT-PCR, nebo FISH vyšly pozitivní.

#### Vysvětlivky

Ž žena, M muž

**MASC** – Sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu, **NA** – nelze analyzovat, **NT** – nebylo testováno, **f** – slabý PCR produkt

## 2.5. Diskuze

Představujeme klinicko-patologickou studii 16 případů nádorů slinných žlaz s histomorfologickými a imunohistochemickými vlastnostmi připomínajícími sekreční karcinom prsu. Po dobu několika let jsme si uvědomovali existenci neobvyklé, doposud nepopsané, charakteristické skupiny nádorů slinných žlaz nesoucích některé morfologické znaky salivárního AcicC a sekrečního karcinomu prsu. Tato skupina nádorů je charakterizovaná silnou pozitivitou v reakci s protilátkou proti vimentinu a S-100 proteinu.

Mikroskopicky jsou nádory charakterizovány lobulárním růstem, přítomností mikrocystických a glandulárních prostor s hojným výskytem eosinofilního, homogenního, nebo pěníteho sekrečního materiálu, který je pozitivní v PAS reakci, v barvení mucicarminem, MUC1 a MUC4.

U všech analyzovatelných případů, kromě jednoho, zahrnutých v naší studii byla odhalena translokace t(12;15)(p13;q25)(ETV6/NTRK3). Tato translokace se běžně vyskytuje u sekrečního karcinomu prsu. Na základě těchto výsledků navrhuje pro tuto skupinu nádorů označení sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu (Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands).

V diferenciální diagnostice připadá v úvahu jako první AcicC. Nádorové buňky MASC připomínají buňky vmezeřených vývodů, mají *low grade* jádra s výraznou jadernou membránou a centrálně lokalizovanými jádérky. Ale nejsou zde přítomny, pro AcicC typické, velké, serózní acinární buňky, které mají v cytoplazmě PAS pozitivní granula připomínající zymogenní granula. Navíc, AcicC je charakterizován cytologickou a strukturní diverzitou. Nalézáme zde směs serózních, acinárních, vmezeřených, duktálních, vakuolizovaných, vodojasných a nespecifických glandulárních buněk uspořádaných do solidních/lobulárních, mikrocystických, papilárně – cystických a folikulárních struktur (6). Oproti tomu MASC je strukturně homogenní, celý tumor je prostoupen mikrocystickými a lehce dilatovanými glandulárními prostory s přítomností sekrečního materiálu v luminu.

Většina případů MASC byla v minulosti klasifikována jako *low grade* cystadenokarcinom blíže nespecifikovaný, nebo AcicC slinných žlaz. Podle našeho názoru může jednotka AcicC, tak jak je popsána v modré knize WHO (6) a svazku AFIP (5) zahrnovat heterogenní skupinu nádorů. MASC se zjevně liší morfologicky od jakýchkoliv doposud známých nádorů slinných žlaz, mají charakteristický imunohistochemický profil a nesou translokaci ETV6-NTRK3, která se nevyskytuje u konvenčního AcicC. Jsme proto přesvědčeni, že MASC reprezentují skutečně samostatnou skupinu a měly by být klasifikovány odděleně od konvenčního AcicC. Hlavním diferenciálně diagnostickým znakem MASC je absence acinárních buněk. Další diagnostická kritéria zahrnují mikrocystický, plástvovitý vzhled složený z malých cyst často splývajících do větších útvarů připomínajících thyroidní folikuly; tubulární prostory obsahující sekreční materiál a uniformní neoplastické buňky s hojnou eosinofilní cytoplazmou, která může mít příležitostně pěnívý vzhled.

V nedávné době bylo prokázáno, že sekreční karcinom prsu nese balancovanou chromozomální translokaci t(12;15)(p13;q25), která vede ke vzniku fúzního produktu tvořeného genem ETV6 z chromozomu 12 a genem NTRK3 z chromozomu 15 (14). V této studii jsme jako první prokázali přítomnost translokace t(12;15)(p13;q25) u MASC. V našem souboru jsme tuto translokaci prokázali u všech případů MASC, kromě jednoho. Negativita u tohoto jednoho případu mohla být důsledkem nízké exprese fúzního produktu (2). Oproti tomu, u žádného ze studovaných konvenčních salivárních AcicC nebyla nalezena translokace zahrnující gen ETV6. Reis-Filho a kol. (12) ve své nedávné studii neprokázali pomocí FISH přítomnost translokace zahrnující gen ETV6 u AcicC prsu. Toto pozorování silně podporuje představu, že sekreční karcinom prsu a AcicC prsu jsou dvě různé nádorové jednotky. Podobně jsme také my přesvědčeni, že naše případy MASC slinných žlaz reprezentují jednotku, která je odlišná od konvenčního salivárního AcicC, resp. jakéhokoliv doposud známého karcinomu slinných žlaz.

Doposud se soudilo, že se sekreční karcinom vyskytuje pouze v mléčné žláze, nicméně my věříme, že tato studie přináší průkaz dalších analogických nádorů vyskytujících se v obou orgánech, kde MASC je protějškem sekrečního karcinomu prsu vyskytujícím se ve slinné žláze.

Navzdory morfologickým a imunohistochemickým podobnostem se sekreční karcinom prsu a MASC slinných žlaz liší pokud jde o klinický průběh. Sekreční karcinomy prsu mají spíše mírný klinický průběh, mají sklon k lokálním recidivám a je pro ně charakteristické delší přežití (9). Oproti tomu salivární MASCs reprezentují široké spektrum klinických manifestací zahrnujících případy s mírným průběhem, ale i případy s rychlým klinickým průběhem charakterizovaným maligní diseminací onemocnění a končící smrtí.

## **2.6. Závěr**

Prostudovali jsme přítomnost translokace t(12;15)(p13;q25) ETV-NTRK3 u souboru konvenčních salivárních AcicC (12 případů), prsních sekrečních karcinomů (3 případy) a u 16 případů MASC. Přítomnost translokace t(12;15)(p13;q25) ETV-NTRK3 byla prokázána u všech analyzovatelných případů MASC, kromě jednoho a u žádného konvenčního salivárního AcicC. MASC se zjevně liší morfologicky od jakýchkoliv doposud známých nádorů slinných žlaz, mají charakteristický imunohistochemický profil a nesou translokaci ETV6-NTRK3, která se nevyskytuje u konvenčního AcicC. Jsme proto přesvědčeni, že MASC reprezentují skutečně samostatnou skupinu a měly by být klasifikovány odděleně od konvenčního AcicC.

Výsledky této studie byly použity k přípravě publikace přijaté do tisku v American Journal of Surgical Pathology (Skalova A., Vanecek T., Sima R., Laco J., Weinreb I., Perez-Ordóñez B., Starek I., Geierova M., Simpson RHW., Passador-Santos F., Ryska A., Leivo I., Kinkor Z., Michal M. Mammary analogue

secretory carcinoma of salivary glands, containing the *ETV6-NTRK3* fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity.).

## 2.7. Summary

We present a series of 16 salivary gland tumors with histomorphological and immunohistochemical features reminiscent of secretory carcinoma of the breast. This is a hitherto undescribed and distinctive salivary gland neoplasm, with features resembling both salivary acinic cell carcinoma and low grade cystadenocarcinoma, as well as displaying strong similarities to breast secretory carcinoma. Microscopically, the tumors have a lobulated growth pattern and are composed of microcystic and glandular spaces with abundant eosinophilic homogenous or bubbly secretory material positive for PAS, mucicarmine, MUC1, MUC4 and mammaglobin. The neoplasms also show strong vimentin, S-100 protein, and STAT5a positivity. For this tumor we propose a designation mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands (MASC).

The 16 patients comprised 9 men and 7 women, with a mean age of 46 years (range 21-75). Thirteen cases occurred in the parotid gland, and one each in the minor salivary glands of the buccal mucosa, upper lip, and palate. The mean size of the tumors was 2.1 cm (range 0.7 to 5.5 cm). The duration of symptoms was recorded in 11 cases and ranged from 2 months to 30 years. Clinical follow-up was available in 13 cases, and ranged from 3 months to 10 years. Four patients suffered local recurrences. Two patients died, one of them due to multiple local recurrences with extension to the temporal bone, and another due to metastatic dissemination to cervical lymph nodes, pleura, pericardium and lungs.

We have demonstrated a t(12;15) (p13;q25) *ETV6-NTRK3* translocation in all but one case of MASC suitable for analysis. One case was not analyzable and another was not available for testing. This translocation was not found in any conventional salivary acinic cell carcinoma (12 cases), nor in other tumor types including pleomorphic adenoma (1 case) and low grade cribriform cystadenocarcinoma (1 case), whereas *ETV6-NTRK3* gene rearrangements were proven in all three tested cases of mammary secretory carcinoma. Thus, our results strongly support the concept that MASC and acinic cell carcinoma are different entities.



## 2.8. Literatura

1. Antonescu CR, Kawai A, Leung DH, Lonardo F, Woodruff JM, Healey JH, Ladanyi M. Strong association of SYT-SSX fusion type and morphologic epithelial differentiation in synovial sarcoma. *Diagn Mol Pathol*. 2000;9(1):1-8.
2. Bourgeois JM, Knezevich SR, Mathers JA, Sorensen PH. Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):937-46.
3. Damiani S, Pasquinelli G, Lamovec J, Peterse JL, Eusebi V. Acinic cell carcinoma of the breast: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch* 2000;437:74-81.
4. Diallo R, Schaeffer KL, Bankfalvi A, et al: Secretory carcinoma of the breast: a distinct variant of invasive ductal carcinoma assessed by comparative genomic hybridization and immunohistochemistry. *Hum Pathol* 2003;34:1299-305.
5. Ellis GL, Auclair PL. Acinic cell adenocarcinoma. In: AFIP Atlas of Tumor Pathology, Fourth Series, Fascicle 9. *Tumors of Salivary Glands*. ARP Press. Silver Spring, Maryland, 2008.
6. Ellis G, Simpson RHW. Acinic cell carcinoma. In: Barnes EL, Eveson JW, Reichart P, et al, eds. World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon, IARC Press, 2005, pp. 216-218.
7. Gaffney R, Chakerian A, O'Connell JX, Mathers J, Garner K, Joste N, Viswanatha DS. Novel fluorescent ligase detection reaction and flow cytometric analysis of SYT-SSX fusions in synovial sarcoma. *J Mol Diagn*. 2003;5:127-135.
8. Hirokawa M, Sugihara K, Sai T, et al. Secretory carcinoma of the breast: a tumour analogous to salivary gland acinic cell carcinoma. *Histopathology* 2002;40:223-229.
9. Krausz T, Jenkins D, Grontoft O, Pollock DJ, Azzopardi JG. Secretory carcinoma of the breast in adults: emphasis on the late recurrence and metastasis. *Histopathology* 1989;14: 25-36.
10. Li Z, Tognon CE, Godinho FJ, et al. ETV6-NTRK3 fusion oncogene initiates breast cancer from committed mammary progenitors via activation of AP1 complex. *Cancer Cell* 2007;12:542-558.
11. McDivitt RW, Stewart FW: Breast carcinoma in children. *JAMA* 1966;195:144-146.
12. Reis-Filho JS, Natrajan R, Vatcheva R, Lambors MBK, Marchio C, Mahler-Araujo B, Paish C, Hodi Z, Eusebi V, Ellis IO. Is acinic cell carcinoma a variant of secretory carcinoma? A FISH study using ETV6 split apart probes. *Histopathology* 2008;52:840-846.
13. Roncaroli F, Lamovec J, Zidar A, Eusebi V. Acinic cell-like carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 1996;429:69-74.
14. Tognon CE, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelly CD, Meinyk N, Mathers JA, Becker L, Corneiro F, MacPherson N, Horsman D, Poremba C, Sorensen PH. Expression of the ETV6-

NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* 2002;2:367-376.

15. Tsuji S, Hisaoka M, Morimitsu Y, Hashimoto H, Shimajiri S, Komiya S, Ushijima M, Nakamura T. Detection of SYT-SSX fusion transcripts in synovial sarcoma by reverse transcription-polymerase chain reaction using archival paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol.* 1998;153:1807–1812.

### 3. Seznam všech publikací autora dizertační práce

1. Hes O, Hora M, Vanecek T, Sima R, Sulc M, Havlicek F, Beranova M, Michal M. Conventional renal cell carcinoma with granulomatous reaction: a report of three cases. *Virchows Arch.* 2003 Aug;443(2):220-1.
2. Boudova L, Vanecek T, Sima R, Bouda J, Hes O, Fakan F. Role of p27Kip1 protein in the cell cycle and its appearance in lymphoid tissues, particularly non-Hodgkin's B-cell lymphomas. (Review). *Cesk Patol.* 2003 Jul;39(3):126-9.
3. Daum O, Hes O, Vanecek T, Benes Z, Sima R, Zamecnik M, Mukensnabl P, Hadravská S, Curik R, Michal M. Vanek's tumor (inflammatory fibroid polyp). Report of 18 cases and comparison with three cases of original Vanek's series. *Ann Diagn Pathol.* 2003 Dec;7(6):337-47.
4. Michal M, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Boudova L, Brouckova M. Primary capillary hemangioblastoma of peripheral soft tissues. *Am J Surg Pathol.* 2004 Jul;28(7):962-6.
5. Daum O, Vanecek T, Sima R, Curik R, Zamecnik M, Yamanaka S, Mukensnabl P, Benes Z, Michal M. Reactive nodular fibrous pseudotumors of the gastrointestinal tract: report of 8 cases. *Int J Surg Pathol.* 2004 Oct;12(4):365-74.
6. Kazakov DV, Pitha J, Sima R, Vanecek T, Shelekhova K, Mukensnabl P, Michal M. Hybrid peripheral nerve sheath tumors: Schwannoma-perineurioma and neurofibroma-perineurioma. A report of three cases in extradigital locations. *Ann Diagn Pathol.* 2005 Feb;9(1):16-23.
7. Kazakov DV, Hes O, Hora M, Sima R, Michal M. Primary intranodal cellular angioliopoma. *Int J Surg Pathol.* 2005 Jan;13(1):99-101.
8. Hes O, Benakova K, Vanecek T, Sima R, Michal M. Clear cell type of renal cell carcinoma with numerous hyaline globules: a diagnostic pitfall. *Pathol Int.* 2005 Mar;55(3):150-4.
9. Daum O, Klecka J, Ferda J, Treska V, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M. Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation. *Virchows Arch.* 2005 Apr;446(4):470-2.
10. Daum O., Sima R., Mukensnabl P., Vanecek T., Brouckova M., Michal M.: Pigmented Solid-Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas. *Pathol Int.* 2005 May;55(5):280-4.
11. Hes O, Vanecek T, Sima R, Hora M, Velickinova H, Grossmann P, Kovar J, Michal M. Tumorous diseases in patients with the testicular feminization syndrome ("androgen insensitivity" syndrome) - description of two cases. *Ceska Gynekol.* 2005 Mar;70(2):113-7.
12. Kazakov DV, Sima R, Michal M. Hemosiderotic fibrohistiocytic lipomatous lesion: clinical correlation with venous stasis. *Virchows Arch.* 2005 Jul;447(1):103-6.
13. Kazakov DV., Vanecek T., Sima R., Kutzner H., Michal M. Dendritic cell neurofibroma with pseudorosettes lacks mutations in exons 1-15 of the neurofibromatosis type 2 gene. *Am J Dermatopathol.* 2005 Aug;27(4):286-9.
14. Boudova L., Kazakov DV., Sima R., Vanecek T., Torlakovic E., Lamovec J., Kutzner H., Szepe P., Plank L., Bouda J., Hes O., Mukensnabl P., Michal M. : Cutaneous lymphoid hyperplasia and other lymphoid infiltrates of the breast nipple: a retrospective clinicopathologic study of 56 patients. *Am J Dermatopathol.* 2005 Oct;27(5):375-86.
15. Kazakov DV, Bisceglia M, Sima R, Michal M. Adenosis tumor of anogenital mammary-like glands: a case report and demonstration of clonality by HUMARA assay. *J Cutan Pathol.* 2006 Jan;33(1):43-6.
16. Kinkor Z, Sima R, Skalova A, Boudova L, Pekova S, Dvorakova D, Dedic K, Kracik M, Janousek M, Michal M. Isolated lymphadenopathy as the first presentation of systemic mastocytosis--description of two cases *Cesk Patol.* 2006 Jan;42(1):34-8.
17. Michal M, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Hes O, Kazakov DV, Matoska J, Zuntova A, Dvorak V, Talerman A. Mixed germ cell sex cord-stromal tumors of the testis and ovary.

- Morphological, immunohistochemical, and molecular genetic study of seven cases. *Virchows Arch.* 2006 Mar 15
18. Kralickova M, Sima R, Vanecek T, Sima P, Rokyta Z, Ulcova-Gallova Z, Sucha R, Uher P, Hes O. Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006 Aug;127(2):231-5
  19. Skalova A, Gnepp DR, Simpson RH, Lewis JE, Janssen D, Sima R, Vanecek T, Di Palma S, Michal M. Clonal nature of sclerosing polycystic adenosis of salivary glands demonstrated by using the polymorphism of the human androgen receptor (HUMARA) locus as a marker. *Am J Surg Pathol.* 2006 Aug;30(8):939-44.
  20. Boudova L, Kazakov DV, Jindra P, Sima R, Vanecek T, Kuntscher V, Vera V, Bouda J, Michal M. Primary cutaneous histiocyte and neutrophil-rich CD30+ and CD56+ anaplastic large-cell lymphoma with prominent angioinvasion and nerve involvement in the forehead and scalp of an immunocompetent woman. *J Cutan Pathol.* 2006 Aug;33(8):584-9.
  21. Kazakov DV, Belousova IE, Sima R, Michal M. Mammary type tubulolobular carcinoma of the anogenital area: report of a case of a unique tumor presumably originating in anogenital mammarylike glands. *Am J Surg Pathol.* 2006 Sep;30(9):1193-6.
  22. Daum O, Grossmann P, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M. Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Ann Diagn Pathol.* 2007 Feb;11(1):27-33.
  23. Belousova IE, Nikonova SM, Sima R, Kazakov DV. Granulomatous slack skin with clonal T-cell receptor-gamma gene rearrangement in skin and lymph node. *Br J Dermatol.* 2007 Jun 15
  24. Kazakov DV, Bisceglia M, Spagnolo DV, Kutzner H, Belousova IE, Hes O, Sima R, Vanecek T, Yang Y, Michal M. Apocrine Mixed Tumors of the Skin With Architectural and/or Cytologic Atypia: A Retrospective Clinicopathologic Study of 18 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2007 Jul;31(7):1094-1102.
  25. Michal M, Kazakov DV, Sima R, Vanecek T. Primitive small cell tumor with epithelial, gangliocytic, neuroendocrine, and mesenchymal differentiation: report of 2 cases. *Int J Surg Pathol.* 2007 Oct;15(4):429-36.
  26. Králíčková M, Sima R, Martínek P, Vanecek T, Ulcová-Gallová Z, Sima P, Krizan J, Kalis V, Stepán Jr, Stepán J, Rokyta Z, Uher P, Hes O. The leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women: the heterozygote transition G to A on the position 3400 does not affect the outcome of the infertility treatment. *Ceska Gynekol.* 2007 Aug;72(4):293-8.
  27. Hes O, Michal M, Sima R, Vaněček T, Brunelli M, Martignoni G, Kuroda N, Alvarado Cabrero I, Perez-Montiel D, Hora M, Urge T, Dvořák M, Jarošová M, Yang X. Renal oncocyoma with and without intravascular extension into the branches of renal vein have the same morphological, immunohistochemical, and genetic features. *Virchows Arch.* 2008 Feb;452(2):193-200.
  28. Králíčková M, Ulcová-Gallová Z, Sima R, Vanecek T, Sima P, Krizan J, Suchá R, Uher P, Hes O, Novotný Z, Rokyta Z, Vetvicka V. Association of the leukemia inhibitory factor gene mutation

and the antiphospholipid antibodies in the peripheral blood of infertile women. *Folia Microbiol (Praha)*. 2007;52(5):543-8.

29. Vazmitel M, Michal M, Shelekhova KV, Sima R, Mukensnabl P, Kazakov DV. Vascular changes in merkel cell carcinoma based on a histopathological study of 92 cases. *Am J Dermatopathol*. 2008 Apr;30(2):106-11.
30. Skalova A, Síma R, Bohuš P, Cuřík R, Lukáš J, Michal M. Endolymphatic sac tumor (aggressive papillary tumor of middle ear and temporal bone) Report of two cases with analysis of the VHL gene. *Pathol Res Pract*. 2008;204(8):599-606.
31. Kazakov DV, Belousova IE, Kacerovska D, Sima R, Vanecek T, Vazmitel M, Pizinger K, Michal M. Hyperplasia of hair follicles and other adnexal structures in cutaneous lymphoproliferative disorders: a study of 53 cases, including so-called pseudolymphomatous folliculitis and overt lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2008 Oct;32(10):1468-78.
32. Hes O, Síma R, Nemcová J, Hora M, Bulimbasic S, Kazakov DV, Urge T, Reischig T, Dvorák M, Michal M. End-stage kidney disease: gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y chromosome in non-neoplastic tissue. *Virchows Arch*. 2008 Oct;453(4):313-9.
33. Shelekhova KV, Sima R, Orlov Alu, Kozakov DV, Michal M. Intraneural perineurioma: clinical and morphological characteristics and a molecular genetic study of the neurofibromatosis type 2 gene. *Arkh Patol*. 2008 Jul-Aug;70(4):20-2.
34. Michal M, Hes O, Nemcova J, Sima R, Kuroda N, Bulimbasic S, Franco M, Sakaida N, Danis D, Kazakov DV, Ohe C, Hora M. Renal angiomyoadenomatous tumor: morphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of a distinct entity. *Virchows Arch*. 2009 Jan;454(1):89-99.
35. Kazakov DV, Zelger B, Rütten A, Vazmitel M, Spagnolo DV, Kacerovska D, Vanecek T, Grossmann P, Sima R, Grayson W, Calonje E, Koren J, Mukensnabl P, Danis D, Michal M. Morphologic Diversity of Malignant Neoplasms Arising in Preexisting Spiradenoma, Cylindroma, and Spiradenocylindroma Based on the Study of 24 Cases, Sporadic or Occurring in the Setting of Brooke-Spiegler Syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2009 Feb 3.
36. Kazakov DV, Ivan D, Kutzner H, Spagnolo DV, Grossmann P, Vanecek T, Sima R, Kacerovska D, Shelekhova KV, Denisjuk N, Hillen U, Kuroda N, Mukensnabl P, Danis D, Michal M. Cutaneous hidradenocarcinoma: a clinicopathological, immunohistochemical, and molecular biologic study of 14 cases, including Her2/neu gene expression/amplification, TP53 gene mutation analysis, and t(11;19) translocation. *Am J Dermatopathol*. 2009 May;31(3):236-47.
37. Kazakov DV, Sima R, Vanecek T, Kutzner H, Palmedo G, Kacerovska D, Grossmann P, Michal M. Mutations in exon 3 of the CTNNB1 gene (beta-catenin gene) in cutaneous adnexal tumors. *Am J Dermatopathol*. 2009 May;31(3):248-55.
38. Bulimbasic S, Ljubanovic D, Sima R, Michal M, Hes O, Kuroda N, Persec Z. Aggressive high-grade mucinous tubular and spindle cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2009 Jun;40(6):906-7.

39. Skálová A, Sima R, Vanecek T, Muller S, Korabecna M, Nemcova J, ElMBERGER G, Leivo I, Passador-Santos F, Walter J, Rousarova M, Jedlickova K, Curik R, Geierova M, Michal M. Acinic Cell Carcinoma With High-grade Transformation: A Report of 9 Cases With Immunohistochemical Study and Analysis of TP53 and HER-2/neu Genes. *Am J Surg Pathol*. 2009 May 20.
40. Kacerovska D, Sima R, Michal M, Hes O, Roucka P, Zarybnicka M, Hora M, Chudacek Z, Kazakov DV. Carney complex: a clinicopathologic and molecular biological study of a sporadic case, including extracutaneous and cutaneous lesions and a novel mutation of the PRKAR1A gene. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Jul;61(1):80-7.
41. Novotný Z, Krízan J, Síma R, Síma P, Uher P, Zech N, Hütelová R, Baborová P, Ulcová-Gallová Z, Subrt I, Ulmanová E, Houdek Z, Rokyta Z, Babuska V, Králícková M. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF outcome. A pilot study. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(3):92-7.
42. Yamaguchi T, Kuroda N, Imamura Y, Hes O, Michal M, Sima R, Nakayama K, Sato N. Imprint cytologic features of chromophobe renal cell carcinoma morphologically resembling renal oncocytoma: Is this an oncocytic variant of chromophobe renal cell carcinoma? *Diagn Cytopathol*. 2009 Nov 25. [Epub ahead of print]
43. Petersson F, Bulimbasic S, Sima R, Michal M, Hora M, Malagon HD, Matoska J, Hes O. Large cell calcifying Sertoli cell tumor: a clinicopathologic study of 1 malignant and 3 benign tumors using histomorphology, immunohistochemistry, ultrastructure, comparative genomic hybridization, and polymerase chain reaction analysis of the PRKAR1A gene. *Hum Pathol*. . [Epub ahead of print]