

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát disertační práce

Molekulární genetické profilování nádor urogenitálního traktu

Molecular genetic profiling of urogenital tumors

Petr Martínek

Plzeň (2015)

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Patologie na Thomákov ústavu patologie LF UK v Plzni.

Uchazez : Mgr. Petr Martínek

Thkolitel: prof. MUDr. Ondřej Hes, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Tomáš Vaněk Ph.D.

Oponenti: Doc. MUDr. Dušan Daniš, CSc.

RNDr. Radek Tma Ph.D.

RNDr. Zbyněk Halbhuber, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne: í í í .

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu Patologie se koná dne: 9.6.2015

Místo obhajoby: Thomákl v ústav patologie, Dr. E. Beneše 13, Plze

S disertační prací je možno se seznámit na děkanát Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plze .

Prof. MUDr. Alena Skálová, CSc.
předseda komise pro obhajobu disertačních prací studijního
programu Patologie
Thomákl v ústav patologie

Obsah

1	Anotace v českém jazyce	5
2	Anotace v anglickém jazyce	6
3	Cíle prací.....	7
4	Výsledky	8
4.1	Genetic testing of leiomyoma tissue in women younger than 30 years old might provide an effective screening approach for the hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC).....	8
4.2	Molecular-genetic analysis is essential for accurate classification of renal carcinoma resembling Xp11.2 translocation carcinoma	9
4.3	Aggressive and nonaggressive translocation t(6;11) renal cell carcinoma: comparative study of 6 cases and review of the literature	10
4.4	Foamy cell (hibernoma-like) change is a rare histopathological feature in renal cell carcinoma.....	11
4.5	The leiomyomatous stroma in renal cell carcinomas is polyclonal and not part of the neoplastic process.....	12
4.6	Distinctive renal cell tumor simulating atrophic kidney with 2 types of microcalcifications. Report of 3 cases.....	12
4.7	Choriogonadotropin positive seminoma - a clinicopathological and molecular genetic study of 15 cases.....	14
4.8	Chromophobe renal cell carcinoma - chromosomal aberration variability and its relation to Paner grading system: an array CGH and FISH analysis of 37 cases.....	15
4.9	Renal cell carcinoma with areas mimicking renal angiomyoadenomatous tumor/clear cell papillary renal cell carcinoma...	16
4.10	Tubulocystic renal cell carcinoma: is there a rational reason for targeted therapy using angiogenic inhibition?	17
4.11	Biphasic alveolosquamoid renal carcinoma: a histomorphological, immunohistochemical, molecular genetic, and ultrastructural study of a distinctive morphologic variant of renal cell carcinoma.....	18
5	Publikace autora, které jsou podkladem dizertace	20
5.1	Impakt faktor <i>asopis</i> , kde byly práce publikovány	22
6	Publikace bez vztahu k tématu dizerta ní práce	23

1 Anotace v českém jazyce

Disertační práce je komentovaným souborem jedenácti článků publikovaných v impaktovaných časopisech vztahujících se k tématu molekulární genetického profilování nádor urogenitálního traktu. V úvodu se rozebírá historie vzniku a vývoje klasifikačních jednotek a stručný pohled aktuálních molekulárně genetických profilů vybraných typů nádorů ledvin. Jsou popsány hlavní signální dráhy vyvíjené v cílené léčbě renálních karcinomů a princip účinku korespondujících preparátů. Jsou zmíněny směry, kterými se ubírá dnešní výzkum nových biomarkerů, a úvod je zakončen stručným pohledem na molekulárně genetické metody používané v klasifikaci renálních karcinomů. Ve výsledcích jsou shrnuty hlavní morfologické, imunohistochemické a molekulárně genetické nálezy studovaných skupin renálních karcinomů. Výsledky jsou porovnány se stávajícími charakteristikami známých nádorových jednotek a z nalezených nesrovnalostí jsou vyvozeny závěry o možných nových entitách nebo příbuznosti zkoumaných nádorů. V závěru jsou zhodnoceny vhodnost a omezení použitých molekulárně genetických metod v kontextu úskalí, která sebou přináší zkoumaný materiál a design popisovaných studií.

2 Anotace v anglickém jazyce

The Ph.D. thesis is a collection of eleven commented articles on the topic of molecular-genetic profiling of urogenital tract tumors published in impact factor journals. In the introduction the origin and development of classification units is described including a brief overview of recent genetic profiles of selected types of renal carcinomas. Reviewed are major signaling pathways exploited in targeted therapy as well as the function of the corresponding drugs. Directions in which the research of new biomarkers is aimed are mentioned and the introduction ends with a short list of molecular genetic methods used in classification of renal carcinomas. In the results section are summarized the most important morphological, immunohistochemical, and molecular genetic findings of the studied sets of renal carcinomas. The data are compared with the present characteristics of known entities and hypotheses of possible new entities or relations between them are inferred. In the conclusions the suitability and limitations of the used molecular genetic methods are discussed in the context of the difficulties of the material analyzed and the designs of the studies.

3 Cíle prací

1. Zjistit incidenci mutací genu FH u skupiny pacientek s dloňními leiomyomy a korelovat s morfoloickými a imunohistochemickými znaky syndromu HLRCC.
2. Molekulárně geneticky vyšetřit a klasifikovat skupinu lézí vykazujících morfoloické znaky Xp11 translokací RK a korelovat tyto výsledky s imunohistochemií.
3. Porovnat vlastnosti skupiny t(6,11) Alpha-TFEB translokací karcinómů mezi agresivními a neagresivními případy.
4. Diferenciálně diagnosticky potvrdit nebo vyloučit přítomnost skupiny morfoloicky nezvyklých RK k jednotce lézí s mutovanou sukcinát dehydrogenázou.
5. Určit zda leiomyomatózní stroma je součástí neoplastického procesu RK.
6. Molekulárně geneticky charakterizovat nádor ledvin připomínající atrofickou ledvinu.
7. Změřit expresi hCG mRNA u klasických seminómů neobsahujících syncytiotrofoblastické buňky.
8. Charakterizovat po etní chromozomální změny u po etné skupiny chromofobních renálních karcinómů a porovnat jejich variabilitu se systémem stupňování podle Panera.
9. Geneticky diferenciálně diagnostikovat skupinu nádorů obsahujících oblasti mikroskopicky definované jako angiomyoadenomatózní/svčobuněný renální karcinóm od svčobuněného a papilárního renálního karcinomu.
10. Zjistit zda je zvýšená exprese mRNA v jedné ze tří vybraných angiogenních signálních drah u skupiny tubulocystických renálních karcinómů.
11. Molekulárně geneticky charakterizovat dvě dosud nepopsané renální léze s dvojí populací buněk.

4 Výsledky

Výsledky dizertační práce jsou obsaženy v následujících deseti publikovaných láncích (a jednom přijatém do tisku), týkajících se tématu práce - šMolekulární genetické profilování nádor urogenitálního traktu, na kterých se autor podílel.

4.1 Genetic testing of leiomyoma tissue in women younger than 30 years old might provide an effective screening approach for the hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC)

V této práci je zkoumána použitelnost specifické strategie cíleného skríningu flenských pacient pro identifikaci syndromu dědičné leiomyomatózy a karcinomu ledvin (HLRCC). Pacienti jsou nositeli zárodkové heterozygotní mutace v genu fumarát hydrogenázy (*FH*). U některých z nich se v průběhu života vyskytne agresivní nádor ledvin. U všech těchto pacientů byly nalezeny symptomatické děložní leiomyomy. Tato studie byla zaměřena na ženy ve věku do 30 let, u kterých byl operován leiomyom. Archivované parafinové bloky s formaldehydem fixovanou tkání byly analyzovány na přítomnost mutace genu *FH*. Byly nalezeny dvě pacientky s potvrzenými zárodkovými mutacemi c.1433_1434dupAAA, p.(Lys477dup); a c.953A>T, p.(His318Leu), které byly následně zahrnuty do programu pravidelných ultrazvukových kontrol. Přítomnost mnoha děložních leiomyomů statisticky významně korelovala s výskytem mutace genu *FH*. Imunohistochemický vzor souvislosti negativity u antigenu FH a positivity u S-(2-sukcino) cysteinu koreloval s genetickými výsledky naší studie pouze v jednom případě. Histomorfologické znaky, mezi které patří zvětšená jádérka v jádrech buněk leiomyomů, jejich vláknitá cytoplazma, přítomnost eosinofilních globulí a parafílipomínající cévy se neukázaly jako specifické pro HLRCC asociované leiomyomy a plně korelovaly s imunohistochemickými a genetickými výsledky pouze v jednom případě. Molekulární genetické testování zůstává jedinou spolehlivou metodou diagnózy HLRCC. Senzitivitu a specificitu přítomnosti mnoha děložních leiomyomů u žen s mutací genu *FH* je

testovaná v této studii. Aplikovaný cílený skrínigový protokol se ukázal jako účinný, byly identifikovány dvě pacientky ze třinácti testovaných.

4.2 Molecular-genetic analysis is essential for accurate classification of renal carcinoma resembling Xp11.2 translocation carcinoma

Na renální karcinomy spojené s Xp11.2 translokací (TRK) se usuzuje v případě, pokud se jedná o karcinom u mladých pacientů, pacientů, kteří podstoupili chemoterapii a pokud karcinom vykazuje znaky odpovídající této entitě. Z archivu TNUP (třítisícového 17500 vzorků) bylo vybráno 20 případů vykazujících morfoloické znaky ukazující na TRK. U devíti případů byl prokázán zlom genu *TFE3* pomocí fluorescenční in-situ hybridizace (FISH). U devíti ze zbylých jedenácti případů (7 mužů a 4 ženy ve věku 22-84 let) byl k dispozici materiál vhodný pro další testování. Morfoloické spektrum bylo rozmanité, některé nádory vykazovaly smíšenou s buněk s eosinofilní nebo světlou cytoplasmou a s tubulární, acinární nebo papilární architekturou. Jeden případ vysokého stupně malignity se vyznačoval oblastmi s epiteliální v etenobuněnou a sarkomatoidní strukturou. Další vykazoval tubulární, solidní a papilární oblasti s jádry v etenobuněné struktury připomínající mucinózní tubulární a v etenobuněný karcinom. Poslední případ obsahoval nesourodá hnízda velkých epiteloidních a histiocytózních buněk na pozadí hustého lymfoplazmatického infiltrátu. Imunohistochemické barvení keratinem AE1/AE3 bylo difúzní pozitivní ve všech případech, protilátka CK7 silně barvila jeden nádor a další slabě a ohniskově. Protilátky CD10 a Pax8 byly exprimovány u osmi případů, AMACR a vimentin u sedmi, CA-IX u čtyřech a TFE3 a katepsin K u dvou případů. U jednoho ze dvou TFE3 pozitivních nádorů byla prokázána polyzomie chromozomu 7 a u druhého polyzomie chromozomu 17. Genetická analýza oblasti genu *VHL* byla u obou nádorů negativní a oba případy byly uzavřeny jako neklasifikovatelné. U tří ze sedmi nádorů negativních na zlom genu *TFE3* byla detekována polyzomie chromozomu 7 nebo 17 zároveň s mutací v genu *VHL* a byly

diagnostikovány jako smíšené SRK/PRK. U jednoho případu negativního na zlom genu *TFE3* a polyzomii chromozom 7 a 17 byla detekována ztráta heterozygotnosti v chromozomální oblasti 3p (lokus genu *VHL*) a tento byl zařazen jako sekundární renální karcinom (SRK). Další *TFE3* negativní případ s polyzomii chromozom 7 a 17, ale bez detekovatelné aberace genu *VHL* byl klasifikován jako papilární renální karcinom. Zbývající dva případy, u kterých nebyla detekována aberace u chr. 7 a 17, ani u genu *VHL* byly uzavřeny jako neklasifikovatelné. Protože morfologické a imunohistochemické znaky translokacních renálních karcinomů jsou velmi rozmanité, pro přesnější řazení do podjednotek této skupiny je nutná molekulární-genetická analýza zaměřená na více parametrů.

4.3 Aggressive and nonaggressive translocation t(6;11) renal cell carcinoma: comparative study of 6 cases and review of the literature

Renální karcinom spojený s translokací t(6;11) (TRK) se popisuje jako vzácný a většinou neagresivní nádor. Kritéria rozlišující agresivní a neagresivní nádory nejsou velmi dobře ustanovená. Do studie bylo zařazeno celkem šest nádorů. Pět z nich se chovalo neagresivně a jeden byl agresivního chování. Nádory byly analyzovány morfologicky, imunohistochemicky a molekulárně-geneticky. Vzorek agresivního t(6;11) translokacního karcinomu pocházel od ženy ve věku 77 let, která zemřela dva a půl měsíce po stanovení diagnózy. Vzorky neagresivních t(6;11) TRK pocházely od tří žen a dvou mužů v rozmezí 15 až 54 let věku. Sledování pacientů probíhalo u všech případů s délkou od dvou až půl měsíce až osmi let. Velikost nádorů se pohybovala mezi třemi až třinácti centimetry u neagresivních, agresivní případ měřil 12 centimetrů. Agresivní nádor byl z velké části nekrotický. Všechny nádory byly dobře ohraničené a vykazovaly solidní nebo alveolární strukturu s obvyklými tubulami a pseudorozetami. V agresivním nádoru byly nalezeny ohniskové pseudopapilární útvary ohraničené bizarními polymorfními buňkami. Mitózy byly nalezeny pouze vzácně. Všechny případy byly pozitivní na barvení protilátkami HMB-45, Melan-A, Katepsin K a

cytokeratiny. Protilátka CD117 byla pozitivní u ty z p ti neagresivních p ípad a u primárních a metastatických lézí agresivního p ípadu. Barvení protilátkou MTOR bylo pozitivní u dvou z p ti a vimentinem u ty z p ti neagresivních p ípad . Vimentin byl negativní u primární léze a u metastází nalezených v nadledvinkách. Translokace t(6;11)(Alpha-TFEB) nebo zlom genu TFEB byl detekován u agresivního, a ty z p ti neagresivních p ípad . Agresivní p ípad vykazoval amplifikaci lokusu TFEB. Ztráty části chromozomu 1 a chromozomu 22 byly detekovány u agresivního a jednoho neagresivního p ípadu. Záv r: Agresivní t(6;11) TRK se obecn vyskytují u pacient vy—fho v ku ve srovnání s jejich neagresivní variantou. Podle histologických kritérií t i z p ti dosud publikovaných p ípad nebyly typické pro t(6;11) TRK. Dva z t chto t í p ípad postrádaly malobun nou sou ást a jeden p ípomínal sv tlobun ý renální karcinom. Nekrózy byly nalezeny pouze u agresivních p ípad . Amplifikace lokusu TFEB byla nalezena pouze u námi publikovaného agresivního p ípadu.

4.4 Foamy cell (hibernoma-like) change is a rare histopathological feature in renal cell carcinoma

Popisujeme dev t pacient s renálním karcinomem (sedm mužl a dv feny, medián v ku 64 let a rozsah v k 51- 79 let), který obsahoval významnou komponentu neoplastických epiteliálních bun k s výrazným vzhledem cytoplazmy s mikro vakuolami (p ípomínajícími hibernom). Velikosti nádor se pohybovaly v rozsahu 1,5 - 8 cm (pr m r 4,2 cm a medián 4,3 cm). Základní struktura nádor byla u dvou p ípad solidn alveolární a u sedmi p ípad papilární. Jaderné skóre podle Fuhrmana bylo u v—ech p ípad t i. Pomocí imunohistochemie vykazovaly bu ky s mikro vakuolami výrazné barvení adipophilinem a antimitochondriální protilátkou ve stejném cytoplazmatickém vzoru. Z pohledu ultrastrukturální charakteristiky byla cytoplazma neoplastických bun k plná zv t—ených mitochondrií, v t—inou obsahujících vrstevnaté krysty. Mezi mitochondriemi byly rozptýlené po etné mikrovezikuly. Muta ní analýza genu *SDHB* byla negativní u v—ech

p ípad . Na základ na-ích poznatk usuzujeme, že mechanismem vzniku tohoto fenoménu je abnormální mezibun né zpracování lipid . U -esti pacient , u kterých byla dostupná data o dal-ím sledování, nebylo pozorováno agresivní chování t chto nádor .

4.5 The leiomyomatous stroma in renal cell carcinomas is polyclonal and not part of the neoplastic process

N které renální epiteliální nádory jako je angiomyoadenomatózní RK a sv tlobun ný papilární RK obsahují r zn výrazné hladkosvalové stroma. Celkov jsme identifikovali 27 ledvinných karcinom s výraznou hladkosvalovou stromální komponentou (HSK). Vzhledem k vyuffití analýzy lokusu receptoru lidského androgenu (HUMARA) bylo možné dále za adit jen feny. Kone ná sestava ítala 14 lézí: 4 angiomyoadenomatózní tumory/sv tlobun né papilární karcinomy, 5 konven ních sv tlobun ných karcinom , 2 konven ní papilární karcinomy a 3 šledvinné karcinomy s hojným hladkosvalovým stromatemō, u kterých jsme se zam íli na klonalitu HSK. Pomocí HUMARA jsme zjistili polyklonální, šreaktivníō p vod HSK u v-ech vy-et itelných (8/14) p ípad . Na základ morfologického charakteru p edpokládáme, že non-neoplastická HSK pravd podobn vychází z bun k hladké svaloviny fil z periferní kapsulární oblasti nádoru nebo z kolagenních sept uvnit tumor . HSK n kdy tvo í podstatnou ást renální nádorové tkán , kterou evidentn není možné ovlivnit cílenou lé bou. Lze tak áste n vysv tlit nerovnom rnou odpov n kterých tumor na biologickou lé bu.

4.6 Distinctive renal cell tumor simulating atrophic kidney with 2 types of microcalcifications. Report of 3 cases

Popisujeme t i p ípady primárních renálních karcinom napodobujících atrofické ledviny s charakteristickými morofologickými, imunohistochemickými a molekulárn -genetickými vlastnostmi. Vzorky byly vybrány ze sbírky více než sedmnácti tisíc renálních karcinom plze ského nádorového registru. Tkán pro sv telnou mikroskopii byly rutin zpracovány a barveny

hematoxylinem a eosinem. Nádory byly dále analyzovány pomocí imunohistochemie, komparativní genomové hybridizace na ipech, mutační analýzy genu *VHL*, ztráty heterozygotnosti oblasti chromozomu 3p a analýzy klonality pomocí lokusu receptoru lidského androgenu. Pacienti byli dva ženy a jeden muž, ve věku v rozmezí 29 až 35 let. Makroskopicky byly nádory zapouzdřené a kulaté, průměr největšího byl 3,5 cm. Délka dalšího sledování pacientů byla v rozmezí dvou až třinácti let (osm let v průměru). Nebylo pozorováno agresivní chování nádoru. Histologicky byly nádory složené z eosinofilních folikulárních velikostí, které byly vyplněny eosinofilním sekretem, podobně jako je tomu u parenchymu periferních atrofických ledvin (po zánětu ledvin). Vzácně se vyskytovaly oblasti splasklých folikulů. Každý folikul byl zásoben malou vlásečnicí. Stroma byla rozvolněná, neztěsněná a ohniskově vláknitá. Byly pozorovány dva typy kalcifikací: typická tubulární - psamomy a amorfní tmavomodře barvená kalcifikace ložiska. Imunohistochemicky byly nádory silně pozitivní na barvení cytokeratiny (OSCAR), CD10 a vimentin. Slabě se barvily protilátky CAM5.2 a AE1-AE3. Protilátky WT1 a katepsin byly slabě a ložiskově a difúzně pozitivní. Nádory byly negativní na barvení protilátkami cytokeratin 20, karbonovou anhydrázou IX, parvalbuminem, HMB45, TTF1, TFE3, chromograninem A, thyroglobulinem, PAX8 a ALK. Pouze DNA z případu 1 byla použitelná pro další genetické analýzy. Nebyla nalezena mutace genu *VHL*, hypermetylace promotoru genu *VHL* a ztráta heterozygotnosti lokusu 3p byly negativní. Komparativní genomová hybridizace neukázala žádné chromozomální numerické aberace. Analýza klonality pomocí lidského androgen receptoru prokázala klonální provedení nádoru. Představujeme neznámý typ nádoru ledvin, který má tyto vlastnosti:

- 1) připomíná atrofickou ledvinu nebo nodulární strumu štítné žlázy
- 2) obsahuje leiomyomatózní kapsule a dva druhy kalcifikací
- 3) chybí mu mitózy, atypické buňky, nekrózy, hemoragie a tím nevykazuje Ki-67 pozitivitu

4) dosud bylo pozorováno benigní biologické chování nádoru

4.7 Choriogonadotropin positive seminoma - a clinicopathological and molecular genetic study of 15 cases

Přítomnost syncytiotrofoblastických buněk pozitivních na lidský choriový gonadotropin (hCG) u klasického seminomu (KS) je dobře zdokumentována. Klasický seminom se značí hCG pozitivitou, který neobsahuje syncytiotrofoblastické buňky je naopak velmi vzácný. V této studii představujeme 15 takovýchto případů, vybraných ze 168 případů vedených v plzeňském nádorovém registru. Případy klasických seminomů s přítomností germinálních buněk a klasické seminomy obsahující syncytiotrofoblastické buňky byly vyloučeny. Pro další analýzy byly vybrány případy s úplnou zapouzdřenou masou nádoru. Všechny 15 případů bylo imunohistochemicky barveno hCG protilátkou. Pozitivní případy byly dále testovány pomocí reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí. Byly identifikovány dvě skupiny hCG pozitivních klasických seminomů. První skupina obsahovala případy se značí hCG pozitivitou, potvrzenou silnou expresí mRNA genu lidského choriového gonadotropinu (CGβ). Tato skupina byla složená z deseti pacientů s průměrným věkem 37,7 let a průměrnou velikostí nádoru 4,96 cm. Osm případů bylo stupně pT1 a dva případy pT3 podle systému TMN 2009. Zvýšená hladina hCG v krvi před operací byla naměřena u osmi pacientů z deseti. U dvou případů nebyla hladina hCG v krvi testována. Druhá skupina sestávala z případů se silnou hCG pozitivitou omezenou na ojedinělé buňky roztroušené po celém nádoru. Byla detekována pouze slabá exprese CGβ mRNA. Skupinu tvořilo pět pacientů s průměrným věkem 34 let a průměrnou velikostí nádoru 4,7 cm. Tyto případy byly stupně pT1 a jeden pT2. Průměrná doba dalšího sledování byla 3,1 roku. Zvýšená hladina hCG v krvi před operací byla naměřena u jednoho pacienta. Z uvedených výsledků vyvozujeme, že exprese hCG u klasických seminomů není limitována na syncytiotrofoblastické buňky. V této studii popisujeme dva druhy

imunohistochemické hCG pozitivitu u klasických seminom : difúzní barvení u v t-iny nádorových bun k a barvení ojedín lých bun k roztrou-ěných po celém nádoru.

4.8 Chromophobe renal cell carcinoma - chromosomal aberration variability and its relation to Paner grading system: an array CGH and FISH analysis of 37 cases

Chromofobní renální karcinom (ChRK) je na genetické úrovni charakterizován mnoho etnými chromozomálními aberacemi, zejména ztrátami chromozom . Ztráty nej ast ji zahrnují chromozomy íslo 1, 2, 6, 10, 13, 17 a 21. Systém stup ování karcinom podle Fuhrmanové postrádá prognostický význam pro ChRK a také v poslední dob byl Panerem navržen nový systém. Cílem této studie bylo zmapovat spektrum chromozomálních aberací u velké skupiny ChRK a vztáhnout tyto poznatky k systému stup ování navrženého Panerem. Byla vybrána skupina 37 p ípad ChrCC a rozt íd na do p ti skupin podle Panera: stupe 1 ó 3, agresivní a sarkomatoidní nádory. Jako agresivní nádory byly ozna éné v-echny p ípady se známou metastatickou aktivitou, místním op tovným výskytem, agresivním pror stáním do okolních orgán nebo invazivním r stem do ledvinové jamky (nehled na intravazaci). Sarkomatoidní nádory byly rozd lené na epiteliální a sarkomatoidní komponentu a molekulárn genetické analýzy na nich byly provád ěny odd len . Komparativní genomová hybridizace na ípu nebo fluorescen ní in-situ hybridizace byla provedena u 42 vzork z 37 p ípad . Byly detekovány mnoho etné ztráty, ale i zisky chromozom . Z celkového po tu 37 vy-et ěných p ípad byly nej ast ji detekované ztráty chromozomu 1 (27x), 2 (26x), 6 (23x), 10 (26x), 13 (19x) a 17 (24x). Dále byla detekována ztráta chromozomu 21 ve dvanácti p ípadech. Nej ast ji detekované zisky byly detekovány u chromozom 4 (22/37), 7 (24/37), 15 (20/37), 19 (22/37) a 20 (21/37). Klastrová analýza ukázala, fle neexistuje fládný signifikantní vztah mezi Panerovými stupni a vzorem chromozomálních zm n u jednotlivých p ípad . Z uvedených poznatk jsme vytvo ili následující záv ry. Chromofobní renální

karcinomy vykazují výrazné šířící spektrum chromozomálních změn, nebylo dříve uznáváno. Kromě dříve popisovaných ztrát chromozomů bylo nalezeno i významné procento chromozomálních zisků. Tyto zisky se vyskytují u chromozomů 4, 7, 15, 19 a 20. Nebyl prokázán fládný vztah mezi Panerovým systémem stupňování a vzorem chromozomálních změn u ChRK.

4.9 Renal cell carcinoma with areas mimicking renal angiomyoadenomatous tumor/clear cell papillary renal cell carcinoma

Popisujeme skupinu osmi renálních karcinomů, které vykazovaly při světelné mikroskopii vzhled angiomyoadenomatózního/světlobuněného (RAT/SRK) renálního karcinomu o rozsahu 5-95% ploch tkáně, které nesplňovaly kritéria zařazení do této skupiny. Vyjma jednoho vzácného případu vykazovaly histopatologické znaky konvenčního světlobuněného karcinomu (v rozsahu 75-95%). V těchto případech ze sedmi konvenčního světlobuněného vzhledu byla tato diagnóza podpořena molekulárně-geneticky přítomností aberace genu *VHL* (mutace v kódující oblasti a/nebo hypermetylace promotoru a/nebo ztráta heterozygotnosti chromozomu 3p). Z dalších dvou případů se světlobuněnou morfologií ani jeden nádor neobsahoval fládnou aberaci genu *VHL*, zato chromozomy 7 a 17 byly v jednom případě dizomické a v druhém polyzomické. Zbývající nádor se vyznačoval (95%) RAT/SRK morfologií, obsahoval mutaci genu *VHL* a byl polyzomický u chromozomů 7 a 17. U těchto případů s histomorfologickými a molekulárně-genetickými znaky světlobuněného renálního karcinomu jsme detekovali významnou imunoreaktivitu s α -methylacyl-CoA racemázou u dvou případů a silnou difúzní imunopozitivitu u cytokeratinu 7 u tří případů. Kromě této kombinace pozitivit u α -methylacyl-CoA racemázy a cytokeratinu 7, nic nenabývalo přítomnosti konvenčního papilárního renálního karcinomu s převahou buněk se světlobuněnou cytoplazmou.

4.10 Tubulocystic renal cell carcinoma: is there a rational reason for targeted therapy using angiogenic inhibition?

Pacienti s renálním karcinomem se v obecně považují za kandidáty pro antiangiogenní léčbu. Tubulocystický renální karcinom (TCRK) je nedávno popsána entita, která se může chovat agresivně, a odvodnění pro antiangiogenní léčbu u této skupiny nádorů nebylo dosud zjištěno. U sedmi případů TCRK a pět kontrolních nenádorových tkání ze sedmi pacientů byla provedena expresní analýza mRNA –estnácti genů zapojených ve těchto angiogenních signálních drahách. Jednalo se o signální dráhy zahrnující 1) Von Hippel-Lindau tumor supresor/hypoxií indukované faktory (*VHL/HIF*), 2) receptorové tyrosin kinázy/mitogeny aktivované protein kinázy (*RTK/MAPK*), 3) a dráha kináz *PIK3CA/AKT/MTOR*. Poslední dvě jmenované dráhy jsou klíčovými terčemi antiangiogenních agens. Také byl zjištěn status genu *VHL* a pomocí imunohistochemie byly zjištěny hladiny vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A (*VEGFA*), hypoxií indukovaných faktorů *HIF1A*, *EPAS1*, a fosforylovaného proteinu *MTOR*. Porovnáním vzorků nádorů a kontrolních nenádorových tkání nebyla zjištěna rozdílná exprese v těchto genech *VHL*, *HIF1A*, *EPAS1*, *PTEN*, *AKT2*, *AKT3*, *MTOR*, *VEGFA*, *KDR*, *HRAS*, *JUN*, *EGFR*, and *FGF2*. U nádorů byla zjištěna signifikantně zvýšená hladina mRNA genu *TP53*, zatímco hladiny mRNA genů *FLT1* a *FOS* byly sníženy. Nebyla nalezena žádná mutace ani metylace promotoru genu *VHL*. Nebyly nalezeny žádné změny v hladinách studovaných proteinů *VEGFA*, *HIF1A*, *EPAS1*, ani zvýšená fosforylace *MTOR*. Tyto studované dráhy (*VHL/HIF*, *RTK/MAPK* a *PIK3CA/AKT/MTOR*) se nezdají být aktivované u TCRK, z čehož vyplývá, že obecné doporučení antiangiogenních terapií nejspíše nemá odvodnění.

4.11 Biphasic alveolosquamoid renal carcinoma: a histomorphological, immunohistochemical, molecular genetic, and ultrastructural study of a distinctive morphologic variant of renal cell carcinoma

Bylo publikováno pouze několik případů sarkomatoidních renálních karcinomů se squamózní diferenciací. Popisujeme dva případy renálních karcinomů obsahujících dosud nepopsanou dvojí populaci buněk. Více zastoupená byla alveolární architektura, která se diferencovala do skvamózních buněk. Fládný z nádorů nevykazoval známky sarkomatoidní transformace. Oba nádory byly podrobeny rutinní histologické a ultrastrukturální analýze, imunohistochemickému barvení, komparativní genomické hybridizaci na *in situ*, konfirmací fluorescenční *in situ* hybridizací a analýze ztráty heterozygotnosti. Velikost nádorů byla 3 a 4 cm, byly lokalizované uvnitř renálního parenchymu a neměly fládné spojení s ledvinovou páňkou. Oba nádory byly tvořeny dvojí populací buněk. V *in situ* nádorové buňky vykazovaly skvamózní znaky a tvořily dobře ohraničené pevné alveolární ostrůvky, které byly v *in situ* obklopené komponentou složenou z malých buněk. Skvamózní buňky byly imunoreaktivní k cytokeratinům (AE1-AE3, Cam 5.2, CK5/6, CK7 a CK20), epiteliálnímu membránovému antigenu, recemáze/AMACR a karboanhydráze IX (v jednom z případů ohniskově). Populace malých buněk byla imunoreaktivní pouze k cytokeratinu CK7, epiteliálnímu membránovému antigen a recemáze/AMACR, kdežto CK20, AE1-3 a karboanhydráza IX byly negativní. Protilátka CD10 byla ohniskově pozitivní ve velkých skvamózních buňkách u jednoho případu. Kathepsin K, E-kadherin a CD117 byly ohniskově pozitivní u jedné z komponent u jednoho případu. Ostatní protilátky Vimentin, RCC marker, parvalbumin, S100 protein, S100 A1, p63, p53, CDX2, uroplakin III, HMB45, TFE3, WT1, synaptofyzin, chromogranin A, tyroglobulin a TTF1 byly negativní. Proliferativní aktivita (MIB-1/Ki-67) byla nízká (1%) v malobuněčné komponentě obou případů, zatímco velké buňky vykazovaly výraznou vyšší proliferativní aktivitu (20-35%). Ultrastrukturální analýza prokázala přítomnost desmozómů a

tonofilament ve velkých buňkách, potvrzující skvamózní diferenciaci v této subpopulaci nádorových buněk. Komparativní genomová hybridizace jednoho analyzovatelného případu prokázaly ztráty celých chromozomů nebo jejich částí (2, 5, 6, 9, 12, 15, 16, 17, 18 a 22) včetně bilaterální ztráty lokusu genu *CDKN2A*. Dále byly nalezeny zisky částí chromozomů 1, 5, 12 a 13. Všechny změny byly potvrzeny pomocí FISH a analýzou ztráty heterozygotnosti. Další sledování pacient nepřineslo žádné známky recidivy nebo metastázy u prvního pacienta. U druhého pacienta byla nalezena podkožní metastáza při diagnóze, ale během následujícího jednoho roku nebyly zjištěny žádné známky recidivy nebo metastázy. Naše data naznačují, že dvou druhový alveolo-skvamózní nádor je vzácný a charakteristický typ nádoru. Subpopulace malých a velkých buněk mají překrývající se, ale rozdílné spektrum exprimovaných proteinů. Byly zjištěny početné chromozomální aberace, které zasahují do oblastí známých tumor supresorových genů a onkogenů.

5 Publikace autora, které jsou podkladem dizertace

- [1] MARTÍNEK, Petr, Ondrej ONDI , Petr GROSSMANN, Ond ej HES, Ji í BOUDA, Norma FRIZZELL a Anthony J. GILL. Genetic testing of leiomyoma tissue in women younger than 30 years old might provide an effective screening approach for the hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC). *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*. v tisku, nedatováno. ISSN 1432-2307.
- [2] HAYES, Malcolm, Kv toslava PECKOVÁ, Petr MARTÍNEK, Milan HORA, Kristýna KALUSOVÁ, Lubomír STRAKA, Ond ej DAUM, Bohuslava KOKOŤKOVÁ, Pavla ROTTEROVÁ, Kristýna PIVOVAR IKOVÁ, Jind ich BRANĚOVSKÝ, Magdalena DUBOVÁ, Pavla VESELÁ, Michal MICHAL a Ond ej HES. Molecular-genetic analysis is essential for accurate classification of renal carcinoma resembling Xp11.2 translocation carcinoma. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* [online]. 2015, ro . 466, . 3, s. 3136-322. ISSN 1432-2307. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-014-1702-7
- [3] PECKOVÁ, Kv toslava, Tomá–VANE EK, Petr MARTÍNEK, Dominic SPAGNOLO, Naoto KURODA, Matteo BRUNELLI, Semir VRANIC, Slavisa DJURICIC, Pavla ROTTEROVÁ, Ond ej DAUM, Bohuslava KOKOŤKOVÁ, Pavla VESELÁ, Kristýna PIVOVAR IKOVÁ, Kevin BAULETH, Magdalena DUBOVÁ, Kristýna KALUSOVÁ, Milan HORA, Michal MICHAL a Ond ej HES. Aggressive and nonaggressive translocation t(6;11) renal cell carcinoma: comparative study of 6 cases and review of the literature. *Annals of Diagnostic Pathology* [online]. 2014, ro . 18, . 6, s. 3516357. ISSN 1532-8198. Dostupné z: doi:10.1016/j.anndiagpath.2014.10.002
- [4] PETERSSON, Fredrik, Maris SPERGA, Stela BULIMBASIC, Petr MARTÍNEK, Marian SVAJDLER, Naoto KURODA, Milan HORA, Roderick SIMPSON, Tomá–TICHÝ, Kv toslava PECKOVÁ, Jind ich BRANĚOVSKÝ, Kristýna PIVOVAR IKOVÁ, Pavla ROTTEROVÁ, Bohuslava KOKOŤKOVÁ, Kevin BAULETH, Dusan MARTINCOK, Vincent NAGY, Michal MICHAL a Ond ej HES. Foamy cell (hibernoma-like) change is a rare histopathological feature in renal cell carcinoma. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* [online]. 2014, ro . 465, . 2, s. 2156224. ISSN 1432-2307. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-014-1600-z

- [5] PETERSSON, Fredrik, Jind ich BRANĚOVSKÝ, Petr MARTÍNEK, Marie KORABE NÁ, Bozo KRUSLIN, Milan HORA, Kvetoslava PECKOVÁ, Kevin BAULETH, Kristyna PIVOVAR ÍKOVÁ, Michal MICHAL, Marián TĚVAJDLER, Maris SPERGA, Stela BULIMBASIC, Xavier LEROY, Boris RYCHLÝ, Sandra TRIVUNIC, Bohuslava KOKOTĚKOVÁ, Pavla ROTTEROVÁ, Miroslav PODHOLA, Saul SUSTER a Ond ej HES. The leiomyomatous stroma in renal cell carcinomas is polyclonal and not part of the neoplastic process. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* [online]. 2014, ro . 465, . 1, s. 89696. ISSN 1432-2307. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-014-1591-9
- [6] HES, Ond ej, Kristýna PIVOVAR ÍKOVÁ, Jan STEHLÍK, Petr MARTÍNEK, Tomá–VAN ĚK, Kevin BAULETH, Olga DOLEJSOVA, Fredrik PETERSSON, Milan HORA, Delia PEREZ MONTIEL, Kv toslava PECKOVÁ, Jind ich BRANĚOVSKÝ, David SLOUKA, Josef VODI KA, Bohuslava KOKOTĚKOVÁ, Radoslav MAT J a Michal MICHAL. Choriogonadotropin positive seminoma-a clinicopathological and molecular genetic study of 15 cases. *Annals of Diagnostic Pathology* [online]. 2014, ro . 18, . 2, s. 89694. ISSN 1532-8198. Dostupné z: doi:10.1016/j.anndiagpath.2013.12.004
- [7] HES, Ond ej, Tulio Geraldo DE SOUZA, Kristýna PIVOVAR ÍKOVÁ, Petr GROSSMANN, Petr MARTÍNEK, Naoto KURODA, Denisa KACEROVSKÁ, Marián TĚVAJDLER, Lubomír STRAKA, Fredrik PETERSSON, Milan HORA a Michal MICHAL. Distinctive renal cell tumor simulating atrophic kidney with 2 types of microcalcifications. Report of 3 cases. *Annals of Diagnostic Pathology* [online]. 2014, ro . 18, . 2, s. 82688. ISSN 1532-8198. Dostupné z: doi:10.1016/j.anndiagpath.2013.12.003
- [8] SPERGA, Maris, Petr MARTÍNEK, Tomá–VANE ĚK, Petr GROSSMANN, Kevin BAULETH, Delia PEREZ-MONTIEL, Isabel ALVARADO-CABRERO, Kristine NEVIDOVSKA, Vilnis LIETUVIETIS, Milan HORA, Michal MICHAL, Fredrik PETERSSON, Naoto KURODA, Saul SUSTER, Jind ich BRANĚOVSKÝ a Ond ej HES. Chromophobe renal cell carcinoma--chromosomal aberration variability and its relation to Paner grading system: an array CGH and FISH analysis of 37 cases. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* [online]. 2013, ro . 463, . 4, s. 5636573. ISSN 1432-2307. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-013-1457-6
- [9] PETERSSON, Fredrik, Petr GROSSMANN, Milan HORA, Maris SPERGA, Delia Perez MONTIEL, Petr MARTÍNEK, Maria Evelyn Cortes GUTIERREZ, Stela BULIMBASIC, Michal MICHAL, Jind ich

BRANĚOVSKÝ a Ondřej HES. Renal cell carcinoma with areas mimicking renal angiomyoadenomatous tumor/clear cell papillary renal cell carcinoma. *Human Pathology* [online]. 2013, ro . 44, . 7, s. 14126-1420. ISSN 1532-8392. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2012.11.019

- [10] STEINER, Petr, Milan HORA, Jan STEHLÍK, Petr MARTÍNEK, Tomáš VANEK, Fredrik PETERSSON, Michal MICHAL, Marie KORABE NÁ, Ivan TRÁVNÍK a Ondřej HES. Tubulocystic renal cell carcinoma: is there a rational reason for targeted therapy using angiogenic inhibition? Analysis of seven cases. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* [online]. 2013, ro . 462, . 2, s. 1836192. ISSN 1432-2307. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-012-1367-z
- [11] PETERSSON, Fredrik, Stela BULIMBASIC, Ondřej HES, Pavol SLÁVIK, Petr MARTÍNEK, Michal MICHAL, Barbora GOMOLÁKOVÁ, Milan HORA a Ivan DAMJANOV. Biphasic alveolosquamoid renal carcinoma: a histomorphological, immunohistochemical, molecular genetic, and ultrastructural study of a distinctive morphologic variant of renal cell carcinoma. *Annals of Diagnostic Pathology* [online]. 2012, ro . 16, . 6, s. 4596469. ISSN 1532-8198. Dostupné z: doi:10.1016/j.anndiagpath.2012.08.007

5.1 Impakt faktor časopisů, kde byly práce publikovány

1. Virchows Archiv: 2,56
2. Annals of Diagnostic Pathology: 1,112
3. Human Pathology: 2,806

6 Publikace bez vztahu k tématu dizerta ní práce

- [1] VAN EK, Tomáš, Zbyněk HALBHUBER, Denisa KACEROVSKÁ, Petr MARTÍNEK, Monika SEDIVCOVÁ, Richard A. CARR, David SLOUKA, Michal MICHAL a Dmitry V. KAZAKOV. Large germline deletions of the CYLD gene in patients with Brooke-Spiegler syndrome and multiple familial trichoepithelioma. *The American Journal of Dermatopathology* [online]. 2014, ro . 36, . 11, s. 8686874. ISSN 1533-0311. Dostupné z: doi:10.1097/DAD.000000000000068
- [2] LHOTSKÁ, P., P. MARTÍNEK, M. EDÍKOVÁ, P. LOŠAN, M. KRÁLÍKOVÁ, V. KALÍKOVÁ a Z. NOVOTNÝ. [Analysis of point mutations in interleukin-11 gene in the population of infertile patients and fertile control women]. *Ceská Gynekologie / Česká Lékařská Společnost J. Ev. Purkyne*. 2014, ro . 79, . 1, s. 48652. ISSN 1210-7832.
- [3] SEDIVCOVÁ, Monika, Petr MARTÍNEK, Jan STEHLÍK, Petr GROSSMANN, Jana KALÍKOVÁ a Tomáš VANEK. [Sequencing - classical method]. *Ceskoslovenská Patologie*. 2013, ro . 49, . 3, s. 1226128. ISSN 1210-7875.
- [4] GROSSMANN, Petr, Tomáš VAN EK, Petr STEINER, Denisa KACEROVSKÁ, Dominic V. SPAGNOLO, Bernard CRIBIER, Christian ROSE, Marina VAZMITEL, J. Andrew CARLSON, Michael EMBERGER, Petr MARTÍNEK, Robert L. PEARCE, John PEARN, Michal MICHAL a Dmitry V. KAZAKOV. Novel and recurrent germline and somatic mutations in a cohort of 67 patients from 48 families with Brooke-Spiegler syndrome including the phenotypic variant of multiple familial trichoepitheliomas and correlation with the histopathologic findings in 379 biopsy specimens. *The American Journal of Dermatopathology* [online]. 2013, ro . 35, . 1, s. 34644. ISSN 1533-0311. Dostupné z: doi:10.1097/DAD.0b013e31824e7658
- [5] KACEROVSKA, Denisa, Kateřina ERNÁ, Petr MARTÍNEK, Petr GROSSMANN, Michal MICHAL, Jan Í A a Dmitry V. KAZAKOV. MSH6 mutation in a family affected by Muir-Torre syndrome. *The American Journal of Dermatopathology* [online]. 2012, ro . 34, . 6, s. 6486652. ISSN 1533-0311. Dostupné z: doi:10.1097/DAD.0b013e3182446fe2