

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Kryštof Marada

Zavedení a optimalizace metod pro sledování minimální diseminované nemoci u
pacientů s ALCL.
Monitoring of minimal disseminated disease in the patients with ALCL - introduction
of dPCR.

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Lenka Krsková, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.04.2025

Na tomto místě bych rád vyjádřil poděkování všem, kteří mě na cestě k dokončení této diplomové práce podporovali. Především děkuji své školitelce RNDr. Lence Krskové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, a také trpělivou podporu během celého zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji všem členům Laboratoře molekulární patologie ve Fakultní nemocnici v Motole, kteří mi poskytli cennou pomoc a umožnili realizaci praktické části zpracovávání diplomové práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za jejich neustálou podporu a motivaci během celého studia.

Obsah

Abstrakt	7
Abstract.....	8
Seznam zkratek.....	9
1 Úvod.....	12
2 Literární přehled	13
2.1 Lymfom.....	13
2.1.1 Hodgkinův lymfom	13
2.1.2 Non-Hodgkinův lymfom	13
2.2 ALK pozitivní anaplastický velkobuněčný lymfom	14
2.2.1 Anaplastický velkobuněčný lymfom – obecné charakteristiky.....	14
2.2.2 Charakteristika ALK+ ALCL.....	15
2.2.3 Morfologické vlastnosti.....	15
2.2.4 Exprese CD30	16
2.2.4.1 Obecné vlastnosti CD30 a vliv na fungování buňky	16
2.2.4.2 Změna ve fungování CD30 u nádorových onemocnění	17
2.2.4.3 Využití CD30 při diagnostice a prognostice	18
2.2.5 Anaplastická lymfomová kináza	19
2.2.5.1 Struktura ALK a její ligandy	19
2.2.5.2 ALK signalizace	20
2.2.5.3 Funkce NPM1	21
2.2.5.4 Mutace zahrnující ALK spojené s rozvojem ALK+ ALCL	23
2.2.5.5 <i>NPM1::ALK</i> signalizační dráhy	24
2.2.5.5.1 PLC- γ signalizační dráha.....	26
2.2.5.5.2 MAPK signalizační dráha.....	26
2.2.5.5.3 PI3K/AKT/mTOR signalizační dráha	27
2.2.5.5.4 JAK/STAT signalizační dráha.....	28
2.2.5.5.5 Epigenetická signalizace	29

2.2.5.6	Využití ALK při diagnostice ALK+ ALCL	32
2.2.6	Další markery specifické pro ALCL	33
2.2.7	Léčba ALK+ ALCL	33
2.2.7.1	Standartní léčba	33
2.2.7.2	Cílená terapie	34
2.3	Diagnostické metody	37
2.3.1	Minimální reziduální nemoc	37
2.3.2	Kvantitativní PCR	37
2.3.3	Digitální PCR	38
3	Cíle práce	39
4	Metody	40
4.1	Použité primery a sondy	40
4.2	Použité vzorky	41
4.3	Izolace nukleové kyseliny	42
4.3.1	Izolace RNA z parafrinových řezů	43
4.3.2	Trizolová izolace RNA z mražené tkáně nebo buněk	44
4.4	Reverzní transkripce	45
4.5	Měření koncentrace	46
4.6	Kvantitativní PCR	48
4.7	Digitální PCR	51
4.8	Sangerovo sekvenování	53
4.9	Navrhování sondy	59
4.10	Sekvenování nové generace	59
5	Výsledky	64
5.1	Srovnání použití dPCR a qPCR při sledování MRN	64
5.2	Porovnání použití vzorků periferní krve a kostní dřeně při sledování MRN u pacientů s ALK+ ALCL	76
5.3	Sledování korelace mezi změnou MRN a klinickým stavem pacienta s diagnózou ALK+ ALCL v čase	79

5.1	Navržení sondy a primerů pro detekci fúzního genu <i>TPM3::ALK</i>	85
5.2	Sledování korelace mezi změnou exprese genu <i>ALK</i> a dalších genů u pacientů s <i>NPM1::ALK</i> , <i>TPM3::ALK</i> a <i>TPM4::ALK</i>	90
5.2.1	Porovnání exprese genů u pacientů s fúzním genem <i>NPM1::ALK</i>	90
5.2.2	Porovnání expresních profilů u pacientů s fúzními geny <i>NPM1::ALK</i> , <i>TPM3::ALK</i> a <i>TPM4::ALK</i>	93
6	Diskuse	96
7	Přílohy	99
8	Seznam literatury	106

Abstrakt

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) představuje vzácnou formu non-Hodgkinova lymfomu, která se primárně vyskytuje u dětské populace a je ve většině případů charakterizována přítomností fúzního transkriptu *NPM1::ALK*. Tento transkript slouží jako klíčový molekulární marker pro detekci minimální reziduální nemoci (MRN), jejíž monitorování má zásadní prognostický význam. Primárním cílem této práce bylo zavedení nové metody digitální PCR (dPCR) pro kvantifikaci *NPM1::ALK* a následné porovnání její senzitivity s běžně používanou metodou kvantitativní PCR (qPCR). Výsledky této studie potvrzují, že dPCR je vhodnou metodou pro citlivou a specifickou detekci fúzních transkriptů u pacientů s ALK+ ALCL, a tvoří základ pro její možné začlenění do rutinního sledování MRN, neboť vykazuje vyšší analytickou senzitivitu a nižší míru ovlivnění inhibicí ve srovnání s qPCR. Dále byla v rámci studie testována a potvrzena korelace mezi změnami hladin MRN, vztaženými k referenčnímu genu, a klinickým vývojem klinického stavu pacienta v čase. Zároveň byla vyvrácena hypotéza o možnosti vynechání referenčního genu při použití dPCR. Součástí práce bylo rovněž navržení a otestování univerzální sondy pro detekci méně časté fúze *TPM3::ALK*. Současně bylo provedeno srovnání detekce *NPM1::ALK* ve vzorcích kostní dřeně a periferní krve. Dalším cílem této studie bylo porovnat expresní profily pacientů s nejčastější fúzí *NPM1::ALK* a zároveň porovnat expresní profil pacientů s majoritním *NPM1::ALK* fúzí a raritními fúzemi jako je *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*. V případě těchto dvou posledních cílů bylo dosažení závěrů limitováno nedostatečným počtem vzorků, a proto by bylo vhodné rozšířit soubor pacientů s raritními fúzními geny.

Klíčová slova: Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL), kináza anaplastického lymfomu (ALK), nukleofosmin 1 (NPM1), minimální reziduální nemoc (MRN), digitální PCR (dPCR)

Abstract

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is a rare subtype of non-Hodgkin lymphoma that primarily affects the pediatric population and is most commonly characterized by the presence of the *NPM1::ALK* fusion transcript. This transcript serves as a crucial molecular marker for the detection of minimal residual disease (MRD), which has significant prognostic value. The primary objective of this study was to implement a novel digital PCR (dPCR) method for the quantification of *NPM1::ALK* and to compare its sensitivity with the routinely used quantitative PCR (qPCR) technique. The results confirm that dPCR is a suitable method for the sensitive and specific detection of fusion transcripts in patients with ALK-positive ALCL and provides a solid basis for its potential application in routine MRD monitoring, as it shows higher analytical sensitivity and is less affected by inhibition compared to quantitative PCR. In addition, this study investigated and confirmed the correlation between changes in MRD levels, normalised to a reference gene, and the patient's clinical status over time. At the same time, the hypothesis of the dispensability of a reference gene in dPCR was refuted. The study also involved the design and validation of a universal probe for the detection of the less common *TPM3::ALK* fusion. Furthermore, a comparison was made between the detection of *NPM1::ALK* in bone marrow and peripheral blood samples. Another aim of this study was to compare expression profiles among patients with the *NPM1::ALK* fusion and also between patients with *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK*, and *TPM4::ALK* fusions. However, these latter objectives were limited by an insufficient number of samples, and although preliminary results were obtained, further investigations with a larger cohort are warranted.

Keywords: Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), anaplastic lymphoma kinase (ALK), nucleophosmin (*NPM*), minimal residual disease (MRD), digital PCR (dPCR)

Seznam zkratek

Zkratka	Definice
aa	Aminokyselina
ABL1	Abelsonova tyrosinkináza 1
ADC	Konjugát protilátky a léčiva (Antibody-drug conjugate)
AD	Žije s aktivním onemocněním (Alive with disease)
AITL	Angioimunoblastický T-lymfom
AKT	Proteinkináza B
ALCL	Anaplastický velkobuněčný lymfom
ALK	Anaplastická lymfomová kináza
AML	Akutní myeloidní leukemie
A-loop	Aktivační smyčka
B2M	Beta-2-mikroglobulin
BIA-ALCL	ALCL asociovaný s prsním implantátem
BL	Burkittův lymfom
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BV	Brentuximab vedotin
CDK	Cyklin-dependentní kinázy
CDK4	Cyklin-dependentní kináza 4
cDNA	Komplementární DNA
Cq	Kvantifikační cyklus
CRD	Doména bohatá na cystein
DAG	Diacylglycerol
DLBCL	Difuzní velkobuněčný B-lymfom
DNMT	DNA metyltransferáza
dPCR	Digitální PCR
DSB	Dvouřetězcové zlomy DNA
EATL	T-buněčný lymfom asociovaný s enteropatií
EBV	Epstein-Barrový virus
ECD	Extracelulární doména
eIF4E	Eukaryotický iniciační faktor 4E
EMA	Epiteliální membránový antigen
EMT	Epiteliálně-mezenchymální přechod
ERK	Kináza regulovaná extracelulárním signálem
FAM	6-karboxyfluorescein
FAM150A	Family with sequence similarity 150A
FAM150B	Family with sequence similarity 150B
FFPET	Formalínem fixovaná a parafrinem zalitá tkáň
FL	Folikulární lymfom
FoxP3	Forkhead box P3
GC	Granulární složka
GEF	Výměnný faktor guaninových nukleotidů (Guanine nucleotide exchange factor)
GSP1	Gene-Specific Primer 1

GSP2	Gene-Specific Primer 2
GvHD	Reakce štěpu proti hostiteli (Graft versus host disease)
HEX	Hexachlorofluorescein
HIF-1α	Hypoxií indukovaný faktor 1 α
HIV	Virus lidské imunodeficiency
HL	Hodgkinův lymfom
HS	High Sensitivity
HTLV-1, HTLV-2	Lidský T-lymfotropní virus typu 1 a 2
ICD	Intracelulární doména
IHC	Imunohistochemické vyšetření
IκBα	Inhibitor κ B α
IL-10	Interleukin 10
IP3	Inositol-1,4,5-trisfosfát
IRK	Inzulínový receptor kináza
KD	Kostní dřev
LDLa	Doména lipoproteinového receptoru s nízkou hustotou třídy A (Low-density lipoprotein receptor class A)
lncRNA	Dlouhá nekódující RNA
LTK	Leukocytární tyrosinkinázový receptor
MALT	Lymfom ze slizniční lymfatické tkáně (Mucosa-associated lymphoid tissue)
MAM	Meprin/A5-protein/PTPmu
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCL	Lymfom z pláštěvých buněk
MLF1	Faktor 1 myeloidní leukemie
MMAE	Monomethyl auristatin E
MRD	Minimální reziduální nemoc (Minimal residual disease - anglicky)
miR/miRNA	mikroRNA
MRN	Minimální reziduální nemoc
mTORC1	Komplex mTOR 1 (mammalian target of rapamycin complex 1)
mTORC2	Komplex mTOR 2 (mammalian target of rapamycin complex 2)
NES	Jaderný exportní signál
NF-κB	Nukleární faktor κ B
NGS	Sekvenování nové generace (Next-generation sequencing)
NH	Nehodnotitelné
NHL	Non-Hodgkinův lymfom
NK buňky	Natural killer buňky
NLS	Jaderný lokalizační signál
NoLS	Nukleolární lokalizační signál
NPM1	Nukleofosmin 1
NTRK	Geny pro neurotrofinní receptorové tyrosinkinázy
OS	Celkové přežití (Overall survival)
OSR	Celková pětiletá míra přežití (5-year overall)

	survival rate)
p70S6K	Ribozomální S6 kináza
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PD-1	Receptor programované buněčné smrti 1
PDK1	Fosfoinositid-dependentní kináza 1
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PIP2	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	Fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PLC-γ	Fosfolipáza C- γ
PRDM16	Protein obsahující PR-doménu 16
PTCL	Periferní T-buněčný lymfom
PTPRB	Receptorová protein-tyrosin fosfatáza typu B
PTPRZ1	Receptorová protein-tyrosin fosfatáza typu Z 1
qPCR	Kvantitativní PCR (Kvantitativní polymerázová řetězová reakce)
Rb	Retinoblastomový protein
Rheb	Protein Ras homolog obohacený v mozku
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	Reaktivní formy kyslíku
rpL5	Ribozomální protein L5
RPM	Otáčky za minutu
RTK	Receptorová tyrosinkináza
S6RP	Ribozomální protein S6
SDS	Dodecylsírán sodný
Shh	Sonic Hedgehog
SOCS-3	Supresor signalizace cytokinů-3
SQ	Počáteční počet kopií (Starting quantity)
TAMs	S nádory asociované makrofágy
TBE	Tris-borát-EDTA
TCM	CD8 ⁺ centrální paměťové T lymfocyty
TCR	T-buněčný receptor
TGF-β	Transformující růstový faktor β
TIMs	Motivy interagující s TRAF
Tm	Teplota tání
TMD	Transmembránová doména
TNF	Tumor nekrotizující faktor
TNFRSF	Superrodina receptorů tumor nekrotizujícího faktoru
TRAF	Faktor asociovaný s receptorem pro TNF
Treg	Regulační T-lymfocyty
TSC2	Tuberin
VEGF	Vaskulární endotelový růstový faktor
WT1	Gen Wilmsova tumoru 1
4E-BP1	Vazebný protein 1 eukaryotického iniciačního faktoru 4E

1 Úvod

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) představuje vzácnou a vysoce agresivní formu non-Hodgkinova lymfomu (NHL), jehož incidence činí méně než 3 % všech případů NHL (X. R. Zhang et al., 2022). Tato diplomová práce je zaměřena na jeho podtyp *ALK*⁺ ALCL, u kterého dochází k patologické aktivaci onkogenu *ALK*, která je způsobena chromosomální translokací, při níž vznikají fúzní geny s různými translokačními partnery, přičemž nejčastěji dochází k fúzi s genem *NPM1* (Wu & Lim, 2023).

Tento typ nádorového onemocnění se typicky vyskytuje u dětské populace a ve srovnání s jinými formami lymfomů vykazuje relativně příznivou prognózu. Pětileté celkové přežití se u pacientů pohybuje v rozmezí 70–90 % (Andraos et al., 2021). I přes obecně příznivý vývoj však dochází u značné části pacientů k relapsu onemocnění. Z tohoto důvodu je nezbytné monitorovat minimální reziduální nemoc (MRN), tedy kvantifikaci přítomnosti specifické mutace v periferní krvi nebo kostní dřeni na subklinické úrovni nemoci v čase, s cílem včasné identifikace vzestupu počtu nádorových buněk (Damm-Welk et al., 2014).

Standardně využívanou metodou pro detekci MRN je kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR). Tato metoda však může selhávat při detekci časných stádií relapsu vzhledem k nižší detekční citlivosti v případech nízké koncentrace cílové mutace a z důvodu vyšší citlivosti k inhibici reakce. Primárním cílem této diplomové práce je zavedení nové metodiky založené na digitální PCR (dPCR) s využitím systému digital LightCycler (Roche) a její následné srovnání s aktuálně nejpoužívanější metodou qPCR při detekci MRN, za účelem zhodnocení, zda dPCR nabízí vyšší senzitivitu a je vhodná pro klinické využití (Quelen et al., 2021).

Sekundárním cílem této práce je porovnání citlivosti detekce MRN při použití vzorků z kostní dřene a periferní krve. Dále bude zkoumán potenciální vztah mezi dynamikou MRN a klinickým stavem pacienta v průběhu času. Vzhledem ke specifickému zaměření použitého systému dPCR na fúzní variantu *NPM1::ALK* bude dalším cílem návrh nové sondy a primerů umožňujících detekci méně častých fúzních variant genu *ALK*.

V závěrečné části práce bude využita metoda sekvenování nové generace (NGS) za účelem charakterizace expresních profilů pacientů nesoucích *NPM1::ALK* fúzi a jejich porovnání s profily pacientů, u nichž jsou přítomny alternativní, méně časté fúzní varianty genu *ALK*.

2 Literární přehled

2.1 Lymfom

Lymfomy představují heterogenní skupinu maligních nádorových onemocnění vznikajících maligní transformací buněk lymfatického systému (Nirmal, 2020). Tato onemocnění tvoří přibližně 5 % všech malignit a jejich celkové přežití (overall survival, OS) se pohybuje kolem 72 % (Jamil & Mukkamalla, 2023). Lymfomy jsou klasifikačně rozdělovány do dvou hlavních podskupin, a to na Hodgkinův lymfom (HL) a non-Hodgkinův lymfom (NHL) (Nirmal, 2020).

2.1.1 Hodgkinův lymfom

Hodgkinův lymfom (HL) je maligní onemocnění charakterizované transformací B-lymfocytů (Weniger & Küppers, 2021). Jedná se o jeden z nejčastějších typů lymfomů ve vyspělých zemích, přičemž incidence tohoto onemocnění dosahuje přibližně 3 nových případů na 100 000 obyvatel za rok. Z klinického hlediska se jedná o diagnózu s relativně příznivou prognózou, neboť více než 80 % pacientů je vyléčeno pomocí standardních terapeutických režimů zahrnujících chemoterapii a radioterapii (Borchmann et al., 2012).

Diagnostickým znakem HL je přítomnost Reed-Sternbergových buněk, abnormálně velkých buněk (až 50 μm v průměru) obsahujících dvě a více jader (Aggarwal & Limaieem, 2022). Diagnóza HL je rovněž založena na charakteristickém imunofenotypu nádorových buněk. Buňky HL jsou obvykle pozitivní v imunohistochemickém průkazu CD30, CD15 a PAX5, a naopak negativní na markery CD20, CD79a, BCL6 a CD45 (H. W. Wang et al., 2019).

2.1.2 Non-Hodgkinův lymfom

Non-Hodgkinův lymfom (NHL) představuje rozsáhlou a heterogenní skupinu maligních lymfoidních neoplazií, která v současnosti zahrnuje více než 60 podtypů, přičemž toto číslo nadále narůstá s pokračujícím objevem nových jednotek spadajících do této klasifikace (Koff et al., 2015; Moubadder et al., 2020). Mezi nejčastěji diagnostikované subtypy NHL patří difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), folikulární lymfom (FL), lymfom ze slizniční lymfatické tkáně (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT), Burkittův lymfom (BL) a lymfom z pláštěvých buněk (MCL) (Koff et al., 2015).

Na rozdíl od Hodgkinova lymfomu, kde dochází výhradně k transformaci B-lymfocytů, může být u NHL postižena širší škála buněčných populací. Přibližně v 85 %

případů dochází k maligní transformaci B-lymfocytů, zatímco ve zbylých 15 % případů jsou postiženy T-lymfocyty či NK buňky (natural killer) (Mafra et al., 2022).

Podle údajů databáze GLOBOCAN bylo v roce 2020 celosvětově diagnostikováno 544 352 nových případů NHL, což představuje 2,8 % ze všech nově diagnostikovaných nádorových onemocnění. V téže roce zemřelo 259 793 pacientů na následky NHL, což odpovídá 2,6 % všech úmrtí způsobených maligními nádory (Sung et al., 2021).

Vzhledem k výrazné biologické a molekulární diverzitě této skupiny nelze u NHL, na rozdíl od HL, stanovit jednotné morfologické ani histologické znaky společné pro všechny podtypy. Tyto znaky se liší v závislosti na buněčné linii, ze které daný lymfom vychází. Lymfomy odvozené od B-lymfocytů typicky exprimují markery CD19, CD20, PAX5, CD79a, Oct-2 a BOB.1. U lymfomů vycházejících z T-lymfocytů je obvykle detekována exprese markerů CD7, CD2, CD5, CD3 a CD4 nebo CD8. Lymfomy pocházející z NK buněk zpravidla exprimují CD2, CD7, CD8, CD56 a CD57 (Nirmal, 2020).

2.2 ALK pozitivní anaplastický velkobuněčný lymfom

2.2.1 Anaplastický velkobuněčný lymfom – obecné charakteristiky

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) představuje vzácnou a agresivní variantu NHL, přičemž tvoří méně než 3 % všech případů NHL (X. R. Zhang et al., 2022). Nejčastěji se vyskytuje v dětské populaci, kde představuje 10–15 % pediatrických NHL, zatímco u dospělých pacientů je jeho incidence výrazně nižší, pohybující se v rozmezí 1–2 % (Quelen et al., 2021). Z hlediska klasifikace NHL je ALCL součástí skupiny periferních T-buněčných lymfomů (PTCL), které celkově tvoří přibližně 15 % všech NHL (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002).

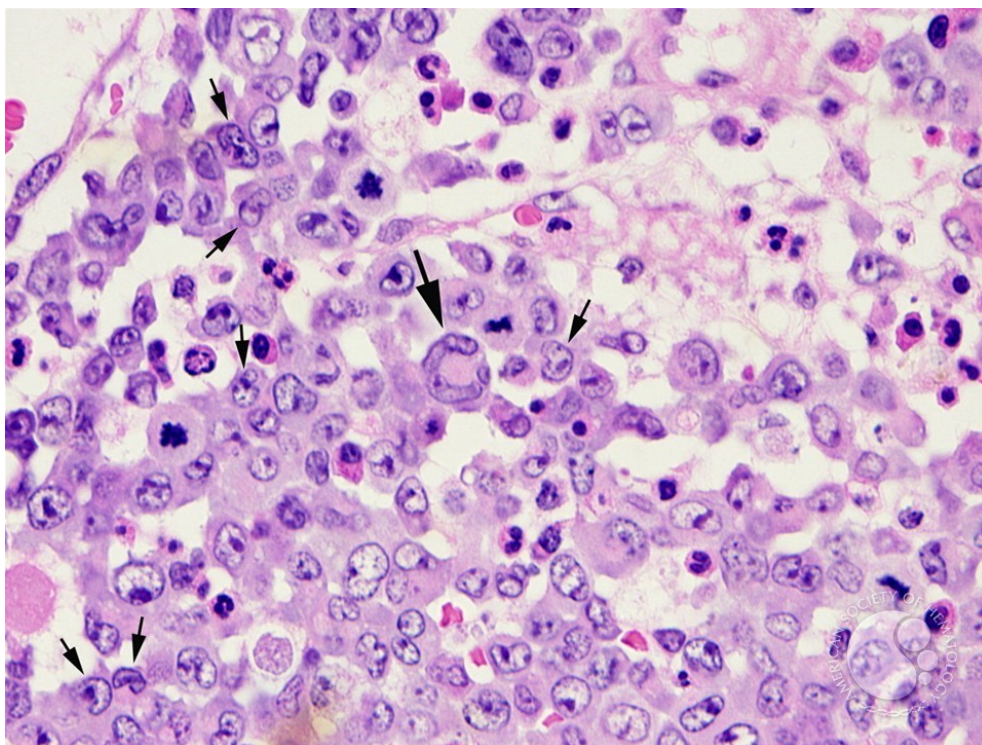
ALCL jsou v současnosti klasifikovány do systémových a nesystémových forem. Mezi systémové ALCL patří ALK-pozitivní (ALK+) ALCL a ALK-negativní (ALK-) ALCL, zatímco mezi nesystémové formy se řadí primární kožní ALCL a ALCL asociovaný s prsním implantátem (BIA-ALCL). Přestože tyto podtypy sdílejí některé společné charakteristiky, vykazují významné rozdíly v řadě aspektů, jako je morfologická variabilita, lokalizace výskytu, klinický průběh onemocnění, incidence a prognostické faktory, včetně pravděpodobnosti pětiletého přežití (X. R. Zhang et al., 2022).

2.2.2 Charakteristika ALK+ ALCL

ALK+ ALCL představuje nejčastější formu T-buněčných lymfomů v pediatrické populaci, zatímco v dospělé populaci se vyskytuje pouze sporadicky. Toto onemocnění zároveň vykazuje vyšší prevalenci u mužů, přičemž poměr nemocných mužů k ženám je přibližně 1,5:1 (Gromowsky et al., 2023). V porovnání s ALK- ALCL a jinými podtypy periferních T-buněčných lymfomů (PTCL) je ALK+ ALCL charakterizováno relativně příznivou prognózou. U pacientů s tímto onemocněním se celková pětiletá míra přežití (OSR, 5-year overall survival rate) pohybuje v rozmezí 70–90 % (Andraos et al., 2021). Kromě lymfatických uzlin může ALK+ ALCL postihovat také měkké tkáně, kůži, kosti a plíce (Stadler et al., 2018).

2.2.3 Morfologické vlastnosti

ALCL se vyznačuje charakteristickými morfologickými rysy, přičemž přibližně 20 % nádorových buněk vykazuje zvětšené jádro s výraznou změnou morfologie do podkovovitého tvaru, obsahujícího několik bazofilních jadérek. Tyto buňky, které slouží jako klíčový diagnostický znak ALCL, jsou označovány jako „hallmark cells“ (Falini, 2001; Pandiar & Smitha, 2019; Singh et al., 2020).



Obrázek 1 Příklad Hallmark cells v kostní dřeni u pacienta s ALK+ ALCL. Na fotografii jsou u buněk označených šipkou dobře viditelné změny jader do tvaru podkovy (Lazarchick, 2011).

2.2.4 Exprese CD30

2.2.4.1 Obecné vlastnosti CD30 a vliv na fungování buňky

Kromě specifických morfologických charakteristik se nádorové buňky ALCL vyznačují výrazně zvýšenou expresí cytokinového receptoru CD30, dříve známého jako Ki-1 antigen. Tento protein umožnil v roce 1985 odlišení této skupiny lymfomů od ostatních T-buněčných lymfomů, což vedlo k jejich původní klasifikaci jako Ki-1 pozitivní anaplastický velkobuněčný lymfom. Později byl tento název změněn, jelikož exprese CD30 není specifická pouze pro tuto skupinu onemocnění, ale vyskytuje se také u dalších nádorů, například u Hodgkinových a Sternberg-Reedových buněk u HL (Schwab et al., 1982; Stein et al., 1985).

CD30 je 120 kDa transmembránový glykoprotein náležející do superrodiny receptorů tumor nekrotizujícího faktoru (TNFRSF). Jeho extracelulární doména obsahuje šest na cystein bohatých domén (CRD), rozdělených do dvou trojic, jejichž vznik je pravděpodobně důsledkem genové duplikace (Schneider & Hübinger, 2002). Tyto dvě skupiny CRD jsou odděleny silně O-glykosylovanou sekvencí s pant připomínající (hinge-like) strukturou (Hansen et al., 2004; Schirrmann et al., 2014).

Cytoplazmatická doména CD30, podobně jako u receptorů CD40, CD27, OX40 či TNFR2, neobsahuje doménu smrti. Namísto ní využívá tzv. motivy interagující s TRAF (TIMs), které umožňují vazbu specifických kombinací faktorů asociovaných s receptorem pro TNF (TRAF). Tato interakce následně iniciuje aktivaci klíčových buněčných signálních drah (Twohig et al., 2011).

V intracelulární oblasti CD30 se nacházejí tři vazebné domény označované jako D1–D3. Domény D2 a D3 patří mezi TIMs a byly identifikovány jako vazebná místa pro TNFR-asociované faktory TRAF1, TRAF2, TRAF3 a TRAF5 (Li, Guo, et al., 2023). Naproti tomu doména D1 nebyla dosud spojena s žádným faktorem TRAF a její přesná funkce zůstává neobjasněná. Experimenty na mutantních myších modelech však ukázaly, že tato doména hraje klíčovou roli v aktivaci signální dráhy nukleárního faktoru κ B (NF- κ B), který je tvořen heterodimerem proteinů p50 a p65. U myší s delecí domén D2 a D3 sice nedocházelo k interakcím s TRAF2 a TRAF5, avšak aktivace NF- κ B přesto probíhala. Naproti tomu delece domény D1 vedla k úplné absenci aktivace NF- κ B, což potvrzuje zásadní roli D1 v tomto signálním procesu (Horie et al., 1998; Osorio et al., 2016).

Ligandem CD30 je cytokin CD30L (CD153, TNFSF8). Jedná se o transmembránový protein patřící do rodiny tumor nekrotizujících faktorů (TNF) typu II, který sestává z 234

aminokyselin a má molekulovou hmotnost 26 kDa. Jeho exprese byla zaznamenána v aktivovaných lymfocytech, granulocytech, histiocytech, žírných buňkách a neutrofilech (Gruss et al., 1996; Smith et al., 1993).

Po navázání tohoto ligandu CD30 trimerizuje a následně se za pomoci TRAF1, TRAF2 a TRAF5, podílí na aktivaci signalizační dráhy NF κ B a mitogenem aktivované proteinkinázové (MAPK) dráhy. Aktivace těchto drah může v závislosti na buněčném typu a mikroprostředí spustit různé buněčné procesy, včetně proliferace a přežití buněk, ale také antiproliferativních účinků a apoptózy (Oflazoglu et al., 2009). Kromě těchto funkcí bylo na myším modelu prokázáno, že CD30 signalizační dráha hraje pravděpodobně významnou roli ve tvorbě CD8⁺ centrálních paměťových T lymfocytů (TCM) po expozici infekčním agens (Nishimura et al., 2005).

Za fyziologických podmínek je exprese CD30 v klidovém stavu omezena na nízké hladiny u vybraných populací imunitních buněk, včetně B a T lymfocytů, monocytů, eozinofilů, makrofágů a NK buněk (Oflazoglu et al., 2009). Bylo však prokázáno, že v případě virové infekce dochází ke zvýšené expresi CD30. Tento fenomén byl popsán zejména v souvislosti s infekcí Epstein-Barrovým virem (EBV), lidským T-lymfotropním virem typu 1 a 2 (HTLV-1, HTLV-2) a virem lidské imunodeficiency (HIV). U HIV bylo navíc prokázáno, že exprese CD30 podporuje zvýšenou produkci virové DNA. Tento mechanismus je zprostředkován aktivací NF- κ B signalizační dráhy prostřednictvím TRAF2, který je indukován interakcí s CD30 (Sotomayor E et al., 2014).

2.2.4.2 Změna ve fungování CD30 u nádorových onemocnění

Ačkoliv je zvýšená exprese CD30 asociována s různými typy nádorových onemocnění, mechanismy vedoucí k této nadměrné expresi se mezi jednotlivými nádory výrazně liší. Tento fenomén byl intenzivně studován zejména u HL a ALCL. Experimentální studie ukázaly, že expozice buněčných linií HL monoklonálními protilátkami Ki-1 nevedla k žádným signifikantním změnám v jejich proliferaci ani přežití. Naproti tomu u buněčných linií ALCL vedlo přidání těchto protilátek k inhibici buněčné proliferace a indukci apoptózy (Hirsch et al., 2008; Mir et al., 2000).

Dále bylo prokázáno, že u HL dochází k trvalé aktivaci NF- κ B nezávisle na signalizaci zprostředkované receptorem CD30. Tento stav je důsledkem mutací v genu pro inhibitor κ B α (I κ B α), který za fyziologických podmínek vytváří trimerický komplex s NF- κ B a inhibuje jeho aktivitu. Za normálních okolností je tento inhibitor degradován až po fosforylaci

kinázami I κ B, což vede k uvolnění NF- κ B a jeho následné aktivaci (Bargou et al., 1996; Emmerich et al., 1999; Osorio et al., 2016; Wood et al., 1998). Na rozdíl od HL však nebyly v případě ALCL detekovány mutace v I κ B α ani v dalších proteinech tvořících heterodimer NF- κ B (Mir et al., 2000). Kromě těchto mechanistických rozdílů bylo při testování buněčných linií s delecemi v jednotlivých doménách CD30 zjištěno, že doména D1 a v menší míře i doména D2 vedou k upregulaci proteinu p21. Zvýšená exprese p21 následně v nádorových buňkách vyvolává zastavení buněčného cyklu, čímž může ovlivnit jejich proliferační kapacitu (Buchan & Al-Shamkhani, 2012).

Stejně jako je tomu u fyziologické funkce CD30 ve zdravých buňkách, ani změny signálních procesů, které probíhají během rozvoje ALCL, nejsou dosud plně prozkoumány a objasněny. Podle závěrů vědeckého týmu Hirsch et al. stimuluje CD30 v buňkách ALCL aktivaci dvou vzájemně protichůdných signálních drah. Aktivace transkripčního faktoru NF- κ B prostřednictvím CD30 vede k podpoře buněčného přežití. Naproti tomu inhibice této dráhy umožňuje CD30-mediovanou aktivaci kaskády proteolytických enzymů, konkrétně štěpení kaspázy-8, kaspázy-3, kaspázy-9, proteinu Bid a PARP, což ve svém důsledku iniciuje apoptotický proces (Hirsch et al., 2008).

2.2.4.3 Využití CD30 při diagnostice a prognostice

Zvýšená exprese CD30 u ALK+ ALCL, stejně jako u dalších nádorových onemocnění, se v současné době využívá jako diagnostický marker v rámci imunohistochemických vyšetření (IHC) (Xu et al., 2020). První objevenou a dosud široce používanou monoklonální protilátkou pro IHC detekci CD30 je Ber-H2, kterou v roce 1989 identifikoval výzkumný tým Schwarting et al. (Schwarting et al., 1989). Vedle Ber-H2 je v současnosti k dispozici více komerčně dostupných protilátek specificky cílených proti CD30, mezi něž patří například BerH83, HRS4 a AC10 (Karube et al., 2021).

Z hlediska prognostické hodnoty není CD30 vhodným prediktorem klinického průběhu ALK+ ALCL, jelikož je ve všech nádorových buňkách exprimován konzistentně ve vysoké míře. Proto je CD30 spíše využíván jako prognostický marker u nádorových onemocnění, kde je jeho exprese mezi jednotlivými případy variabilní. Příkladem takových malignit je angioimunoblastický T-lymfom (AITL), u něhož se míra exprese pohybuje v rozmezí 46–80 %, nebo T-buněčný lymfom asociovaný s enteropatií (EATL), kde exprese CD30 kolísá mezi 50 % a 100 % (Karube et al., 2021).

2.2.5 Anaplastická lymfomová kináza

U ALK⁺ ALCL dochází, na rozdíl od ostatních forem ALCL, ke genetickým změnám v genu *ALK*. Tento gen byl poprvé identifikován týmem Shiota et al. v roce 1994 jako fúze s genem kódujícím nukleofosmin 1 (*NPM1*) (Morris et al., 1994; Shiota et al., 1994). Aberantní exprese *ALK* však byla zaznamenána i u dalších maligních onemocnění, včetně neuroblastomu, rhabdomyosarkomu a nemalobuněčného karcinomu plic (Corao et al., 2009; Friboulet et al., 2014; George et al., 2008).

Gen *ALK*, lokalizovaný na chromosomu 2 v oblasti 2p23.2 až p23.1, kóduje anaplastickou lymfomovou kinázu (ALK), což je receptorová tyrosinkináza (RTK) o délce 1620 aminokyselin (aa). ALK patří spolu s leukocytárním tyrosinkinázovým receptorem (LTK) do podrodiny ALK (Huang, 2018; Lemmon & Schlessinger, 2010). Stejně jako ostatní členové RTK se ALK skládá z extracelulární domény (ECD), transmembránové domény (TMD) a intracelulární domény (ICD) (Lemmon & Schlessinger, 2010).

2.2.5.1 Struktura ALK a její ligandy

Hlavní odlišnost ALK oproti jiným RTK spočívá ve specifické struktuře její ECD, která má délku 1038 aminokyselin (aa) a obsahuje unikátní kombinaci domén. Prvními strukturními komponentami ECD jsou dvě domény meprin/A5-protein/PTPmu (MAM), označované jako MAM1, umístěná mezi 264–427 aa, a MAM2, nacházející se v oblasti 480–626 aa. Funkce těchto domén dosud není zcela objasněna, bylo ale prokázáno, že se podílejí na buněčné adhezi prostřednictvím homofilních interakcí, pravděpodobně za využití čtyř konzervovaných cysteinových reziduí vytvářejících disulfidické můstky (Beckmann & Bork, 1993; Cismasiu et al., 2004). Mezi doménami MAM se v oblasti 453–471 aa nachází doména lipoproteinového receptoru s nízkou hustotou třídy A (LDLa, low-density lipoprotein receptor class A). Výsledná struktura MAM-LDLa-MAM je unikátní pro ALK a nebyla dosud identifikována u žádného jiného RTK. Kromě těchto struktur byly na ECD nalezeny i další specifické sekvence, a to signální peptid na N-konci, v oblasti 1–18 aa, a glycinem bohatá doména, v oblasti 816–940 aa, s dosud neobjasněnou funkcí. Experimenty na modelu *Drosophila melanogaster* však prokázaly její nezbytnost pro správnou funkci ALK receptoru, neboť bodové mutace v této oblasti vedly k úmrtí testovaných jedinců již v prvním larválním stádiu (Lorén et al., 2003).

Doména ICD receptoru ALK obsahuje dvě dobře charakterizované funkční oblasti (Huang, 2018). První z nich je juxtamembránová oblast nacházející se v oblasti 1060 až 1115

aa. Ta v oblasti 1160–1163 aa obsahuje sekvenci D-E-L-D představující místo štěpení kaspázou-3. Proteolytickým štěpením v této oblasti vzniká přibližně 60 kDa fragment ALK, který se přesunuje do cytoplazmy a působí jako proapoptotický faktor zesilující apoptotickou odpověď. Deleční mutační studie naznačují, že proapoptická funkce tohoto segmentu se soustředí do oblasti mezi 1090–1125 aa (Aubry et al., 2015; Mourali et al., 2006). Druhou doménou v ICD je tyrosinkinázová doména. Ta se skládá z konzervovaného aminoterminálního laloku a karboxyterminálního laloku, které jsou od sebe oddělené strukturou aktivační smyčky (A-loop). Tato smyčka obsahuje tři tyrosiny v motivu Y-x-x-x-Y-Y, který je společný pro členy superrodiny kináz inzulinových receptorů (IRK). Tyto tyrosiny slouží jako hlavní autofosforylační místa sloužící k aktivaci enzymatické funkce ALK (Bossi et al., 2010; Hallberg & Palmer, 2016). Oproti ostatním členům superrodiny IRK je zde ale významný rozdíl v trojici aminokyselin, které oddělují první a druhý tyrosin. Zatímco u ostatních IRK jsou tyrosiny odděleny E-T-D, v případě ALK, se zde nachází unikátní sekvence R-A-S. Tato odlišnost zásadně ovlivňuje substrátovou specifitu ALK vůči proteinům, které mohou být fosforylovány jeho tyrosinkinázovou doménou (Donella-Deana et al., 2005).

ICD a ECD jsou od sebe odděleny jednou transmembránovou doménou, která se nachází v oblasti 1039 až 1059 aa (Huang, 2018).

Jako ligandy, které se vážou na lidský ALK a tím spouští jeho signalizační kaskády, byly v roce 2015 identifikovány FAM150A (=Family with sequence similarity 150A) a FAM150B (=Family with sequence similarity 150B), přičemž již v předchozím roce byly tyto molekuly popsány jako ligandy blíže příbuzného LTK (Guan et al., 2015; H. Zhang et al., 2014).

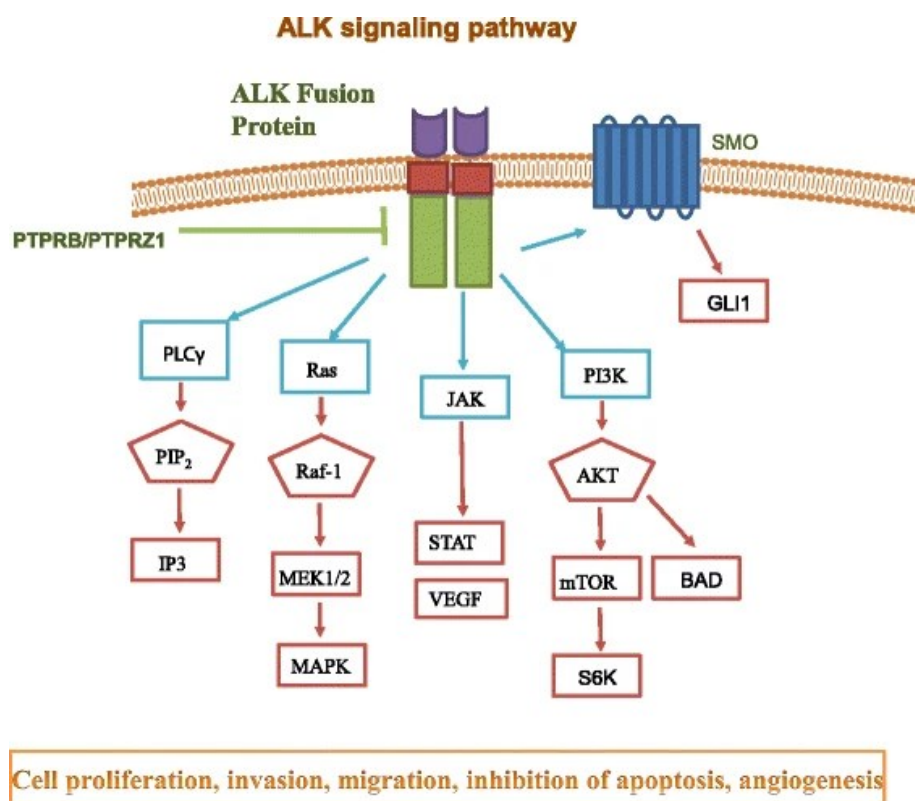
2.2.5.2 ALK signalizace

Stejně jako samotná identifikace proteinu ALK, i výzkum jeho signalizačních drah byl zpočátku prováděn převážně prostřednictvím jeho fúzních variant s NPM1 či jinými fúzními partnery. Následně byla získaná data rozšířena o poznatky z výzkumu neuroblastomu, v jehož rámci byla analyzována také nezkrácená verze receptoru ALK (Hallberg & Palmer, 2016).

Aktivace ALK probíhá prostřednictvím kanonického mechanismu typického pro receptory RTK rodiny. Vazba specifického ligandu na ECD receptoru indukuje jeho homodimerizaci, čímž dochází k prostorovému přiblížení intracelulárních tyrosinkinázových domén. Tento proces umožňuje vzájemnou transautofosforylaci na specifických tyrosinových

reziduích, která následně slouží jako vazebná místa pro adaptorové a efektorové proteiny, čímž se aktivují různé signalizační dráhy (Lodish, 2016). Dosavadní studie prokázaly souvislost signalizace ALK s několika klíčovými buněčnými drahami, mezi něž patří PI3K-AKT, CRKL-C3G, JAK-STAT, Sonic Hedgehog (Shh), MAPK a PLC- γ . Aktivace těchto drah se podílí na regulaci buněčné proliferace, inhibici apoptózy, transformaci buněk a angiogenezi (Della Corte et al., 2018; Hallberg & Palmer, 2016). V nepřítomnosti ligandu je receptor ALK inaktivován defosforylací prostřednictvím protein-tyrosin-fosfatázového komplexu PTPRB/PTPRZ1 (Receptorová protein-tyrosin fosfatáza typu B a Receptorová protein-tyrosin fosfatáza typu Z 1) (Della Corte et al., 2018).

Exprese a signalizace ALK byla spojena hlavně s vývojem a správným fungováním nervového systému. Kromě toho byla jeho exprese detekována také ve varlatech, prostatě, tenkém a tlustém střevě (Della Corte et al., 2018; Iwahara et al., 1997).



Obrázek 2 Signalizační dráhy aktivované receptorem ALK a příklad dějů, které tyto dráhy ovlivňují (Della Corte et al., 2018).

2.2.5.3 Funkce NPM1

Gen *ALK* může podléhat chromosomální translokaci a fúzi s jiným genem, což vede ke změnám ve struktuře a signalizaci receptoru ALK. Tyto alterace představují klíčovou driver mutaci v patogenezi ALK⁺ ALCL, přičemž nejčastější translokace zahrnuje fúzi genu *ALK* s

genem lokalizovaným na chromosomu 5q35, jenž za fyziologických podmínek kóduje protein nukleofosmin 1 (NPM1, B23, Numatrin) (Hindley et al., 2021; Shiota et al., 1994).

NPM1 je protein o délce 294 aminokyselin s molekulární hmotností 37 kDa, který patří do rodiny nukleofosminových jaderných chaperonů, spolu s NPM2 a NPM3 (Eirín-López et al., 2006; Hindley et al., 2021). Strukturně se NPM1 skládá z N-terminální oligomerizační domény obsahující dva jaderné exportní signály (NES), centrální histon-vazebné domény se dvěma jadernými lokalizačními signály (NLS) a C-terminální DNA/RNA-vazebné domény s nukleolárními lokalizačními signály (NoLS). Tato specifická struktura umožňuje dynamickou lokalizaci NPM1 mezi cytoplazmou, nukleoplazmou a jadérkem, což mu umožňuje plnit různé buněčné funkce (Zarka et al., 2020).

Mezi klíčové funkce NPM1 patří regulace duplikace centrozomů, při níž NPM1 váže neduplikované centrozomy a inhibuje jejich duplikaci. Fosforylace NPM1 prostřednictvím komplexu CDK2/cyklin E vede k jeho disociaci, čímž se umožní centrozomální duplikace (Okuda et al., 2000).

Další zásadní úloha NPM1 spočívá v regulaci syntézy ribozomů. Bylo prokázáno, že NPM1 interaguje s ribozomálním proteinem L5 (rpL5), chaperonem pro 5S rRNA, čímž ji stabilizuje za vzniku ribonukleoproteinu (RNP) a transportuje ji do jadérka za účelem sestavení ribozomů (Yu et al., 2006).

NPM1 rovněž tvoří integrální součást vnější granulózní složky (GC) jadérka a podílí se na určení jeho struktury (Feric et al., 2016). Navíc se podílí na aktivaci tumor supresorového proteinu p53 prostřednictvím vazby a inhibice HDM2 (human double minute 2 protein, nazývaný též MDM2), čímž brání HDM2-dependentní degradaci p53 (Kurki et al., 2004). Dále také interaguje přímo s p53 a reguluje jeho stabilitu a transkripční aktivitu v odpovědi na buněčný stres (Colombo et al., 2002).

Kromě výše zmíněných funkcí hraje NPM1 roli v organizaci chromatinu, regulaci transkripce prostřednictvím vazby na histon H1, opravě dvouřetězcových zlomů DNA (DSB) a v procesech embryogeneze (Gadad et al., 2011; Grisendi et al., 2005; Lee et al., 2005). Díky své široké funkční diverzitě je NPM1 klasifikován jak mezi tumor supresory, tak mezi proto-onkogeny. Aberace tohoto proteinu byly kromě ALK⁺ ALCL asociovány i s dalšími malignitami, včetně akutní myeloidní leukemie (AML), glioblastomu, spinocelulárního karcinomu dutiny ústní, hepatocelulárního karcinomu a kolorektálního karcinomu (Box et al.,

2016; Coutinho-Camillo et al., 2010; Falini et al., 2005; Holmberg Olausson et al., 2015; X. Liu et al., 2012; Y. Liu et al., 2012).

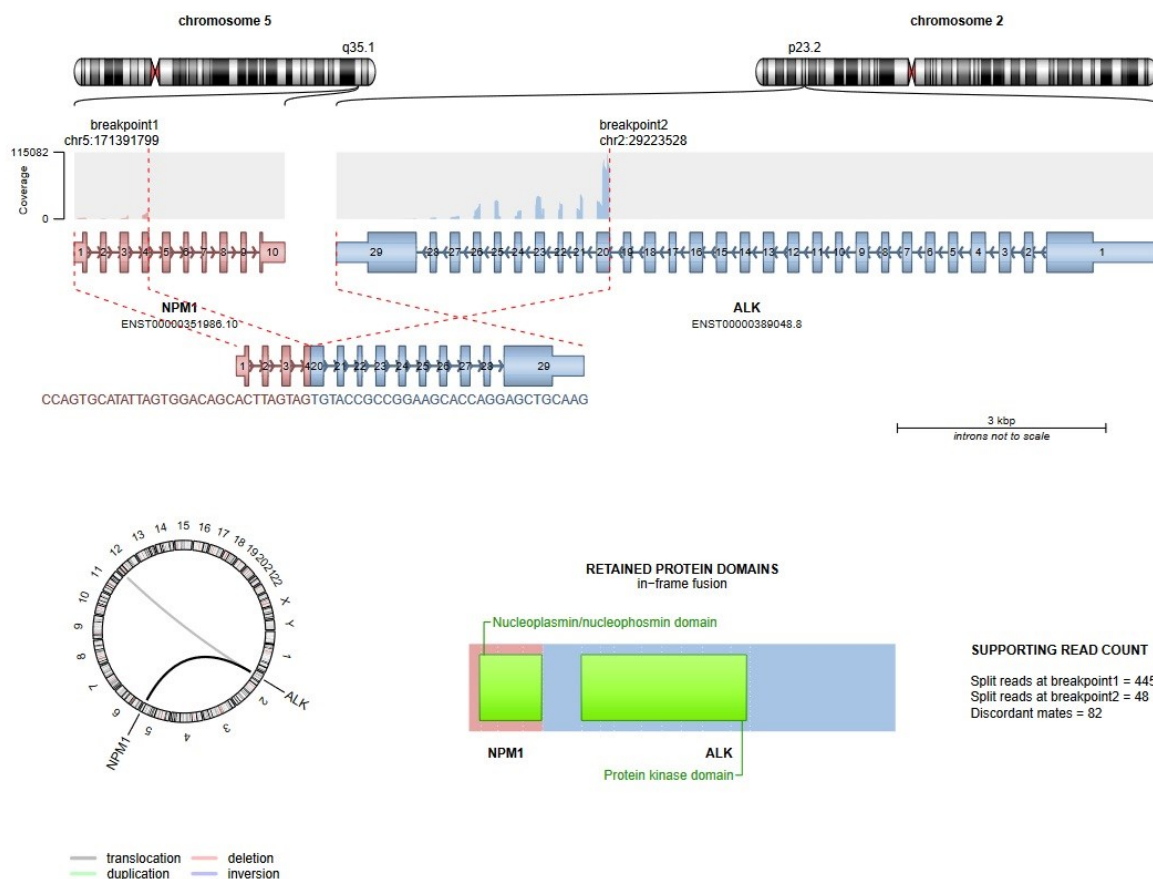
2.2.5.4 Mutace zahrnující ALK spojené s rozvojem ALK+ ALCL

Nejčastější chromosomální translokace t(2;5)(p23;q35) vede k fúzi genu *ALK* s *NPM1*, což se popisuje přibližně u 80 % případů ALK+ ALCL (Shiota et al., 1994). Existují však i méně časté translokace či jiné chromosomální aberace, při nichž *ALK* fúzuje s jinými partnery, jak je znázorněno v následující tabulce (**Tabulka 1**).

Tabulka 1 Chromosomální abnormality zahrnující ALK spojené s rozvojem ALK+ ALCL

Fúzní protein	Název proteinu, jehož gen je fúzuje s genem <i>ALK</i>	Chromosomální abnormalita	Frekvence výskytu v rámci ALK+ ALCL	Reference
<i>NPM1::ALK</i>	Nukleofosmin 1	t(2;5)(p23;q35)	~80 %	(Shiota et al., 1994)
<i>TPM3::ALK</i>	Tropomyosin 3	t(1;2)(q25;p23)	10-15 %	(Lamant et al., 1999)
<i>ATIC::ALK</i>	IMP cyklohydroláza/5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formyltransferáza	inv (2)(p23;q35)	1–2.5 %	(Colleoni et al., 2000)
<i>CLTC::ALK</i>	Těžký řetězec klatrinu	t(2;17)(p23;q23)	1–2.5 %	(Cools et al., 2002)
<i>TFG::ALK</i>	TRK fúzovaný gen	t(2;3)(p23;q21)	1–2.5 %	(Hernández et al., 1999)
<i>TPM4::ALK</i>	Tropomyosin 4	t(2;19)(p23;p13)	<1 %	(Liang et al., 2004)
<i>ALO17::ALK (RNF213::ALK)</i>	Ring finger protein 213	t(2;17)(p23;q25)	<1 %	(Cools et al., 2002)
<i>SQSTM1::ALK</i>	Sekvestrosom 1	t(2;5)(p23;q35)	<1 %	(Kalinova et al., 2024)
<i>MYH9::ALK</i>	Těžký řetězec myosinu 9	t(2;22)(p23;q11.2)	<1 %	(Lamant et al., 2003)
<i>MSN::ALK</i>	Moesin	t(2;X)(p23;q11–12)	<1 %	(Tort et al., 2001)
<i>CAPRIN1::ALK</i>	Protein asociovaný s buněčným cyklem 1	t(2;11)(p23;p13)	<1 %	(Kalinova et al., 2024)
<i>SATB1::ALK</i>	SATB Homeobox 1	t(2;3)(p23;p24)	<1 %	(Kalinova et al., 2024)
<i>TRAF1::ALK</i>	Faktor asociovaný	t(2;9)(p23;q33)	<1 %	(Norimatsu et

	s receptorem TNF 1			al., 2024)
EEF1G::ALK	Eukaryotický translační elongační faktor 1 gamma	t(2;11)(p23;q12)	<1 %	(Palacios et al., 2016)
PABPC1::ALK	Cytoplazmatický protein vázající poly(A) 1	t(2;8)(p23;q22)	<1 %	(Graetz et al., 2019)



Obrázek 3 Schematická vizualizace detekce fúzního transkriptu *NPM1::ALK* pomocí softwaru Arriba (<https://github.com/suhrig/arriba/>) z analýzy pomocí NGS.

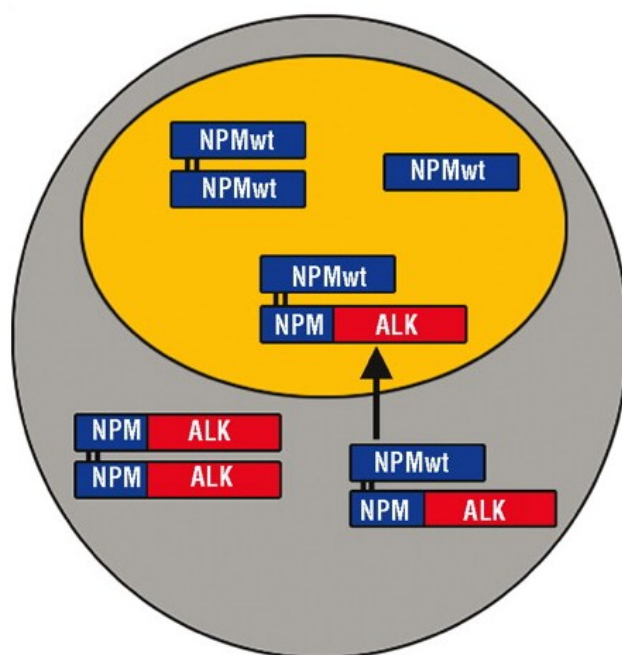
2.2.5.5 *NPM1::ALK* signalizační dráhy

Jak bylo již uvedeno, proteiny ALK a NPM1 se podílejí na řadě signalizačních drah a buněčných procesů, které jsou klíčové pro správnou funkci buňky. Translokace vedoucí ke vzniku fúzního proteinu *NPM1::ALK* však zásadně narušuje jejich regulaci, což je důsledkem specifických domén přítomných v této fúzní variantě (Kourentzi et al., 2020). Při identifikaci místa zlomu, bylo zjištěno, že v případě genu *NPM1* k němu vždy dochází v oblasti intronu 4

a v případě genu *ALK* dochází ke zlomu v 93 % případů v oblasti intronu 19 a v 7 % případů v oblasti exonu 19. Výsledný fúzní gen tedy obsahuje exon 1-4 genu *NPM1* a exony 20-29 genu *ALK* (Cao et al., 2019; Krumbholz et al., 2018). Vzhledem k tomu, že translokační zlom v genu *ALK* nastává mezi oblastí kódující tyrosinkinázovou doménu a transmembránovou doménu, která již poté ve fúzním transkriptu *NPM1::ALK* nenachází, výsledný fúzní protein nefunguje jako klasický transmembránový receptor. Místo toho je lokalizován převážně v cytoplazmě nebo jádře buňky (Kourentzi et al., 2020).

Jaderná translokace *NPM1::ALK* je umožněna přítomností oligomerizační N-koncové domény v *NPM1* části fúzního proteinu, která zprostředkovává tvorbu *NPM* dimerů. Pokud dojde k heterodimerizaci mezi *NPM1::ALK* a *NPM1* divokého typu, může být tento komplex transportován do jádra prostřednictvím jaderné lokalizační sekvence (NLS) obsažené v centrální doméně *NPM1* divokého typu, která u mutované *NPM1::ALK* chybí (Falini et al., 2007).

Vedle heterodimerizace s *NPM1* divokého typu může docházet také k oligomerizaci dvou fúzních proteinů *NPM1::ALK* za vzniku funkčních homodimerů. Tento proces je klíčový pro patogenezi *ALK*⁺ *ALCL*, neboť umožňuje trans-autofosforylaci tyrosinkinázových domén na *ALK* segmentech fúzních proteinů. Výsledkem této fosforylace je konstitutivní aktivace enzymatické aktivity *ALK*, což vede k maligní transformaci (Falini et al., 2007).



Obrázek 4 Možnost translokace *NPM1::ALK* do jádra za pomoci dimerizace s *NPM1* divokého typu (*NPMwt*) (Falini et al., 2007) (Upraveno)

2.2.5.5.1 PLC- γ signální dráha

Jedním z příkladů aberantní signalizace při ALK⁺ ALCL je aktivace signální dráhy fosfolipázy C- γ (PLC- γ). Za fyziologických podmínek je PLC- γ primárně aktivována prostřednictvím receptorových tyrosinkináz (RTK). Po vazbě ligandu na RTK dochází k jejich dimerizaci a následné autofosforylaci intracelulárních tyrosinových zbytků, čímž se vytváří vazebná místa pro SH2 domény PLC- γ . Následná fosforylace specifických tyrosinových zbytků na PLC- γ vede k její aktivaci. Aktivovaná PLC- γ následně katalyzuje štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) za vzniku dvou sekundárních posílů: inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG) (Cocco et al., 2001; Regad, 2015).

IP₃ se váže na receptory vápníkových kanálů na membráně endoplazmatického retikula, čímž dochází k uvolnění Ca²⁺ do cytoplazmy. Zvýšená intracelulární koncentrace Ca²⁺ ovlivňuje široké spektrum buněčných procesů, včetně proliferace, diferenciace, migrace buněk, kontrakce svalových buněk a apoptózy (Mikoshiba, 2015).

V případě DAG je jeho hlavní funkcí aktivace proteinkinázy C. Ta reguluje mnoho buněčných procesů, jako je například genová exprese, sekrece hormonů a cytokinů, buněčná proliferace, diferenciace a apoptóza (Eichmann & Lass, 2015).

V kontextu ALK⁺ ALCL dochází ke konstitutivní fosforylaci tyrosinových zbytků na ALK části fúzního proteinu, což vede k trvalé aktivaci signalizace prostřednictvím PLC- γ . Tento stav vyvolává patologické buněčné procesy, které přispívají k nádorové transformaci. Primárním mechanismem tohoto onkogenního účinku je zvýšená produkce IP₃, vedoucí k narušení intracelulární homeostázy vápníku. Klíčovým tyrosinovým zbytkem odpovědným za fosforylaci PLC- γ v rámci *NPM1::ALK* fúzního proteinu je Y664 (R.-Y. Bai et al., 1998).

2.2.5.5.2 MAPK signální dráha

Další aberantně aktivovanou signální dráhou v kontextu *NPM1::ALK* je signální dráha mitogenem aktivovaných proteinových kináz (MAPK). Podobně jako v případě dalších drah dochází po vazbě ligandu na receptorovou tyrosinkinázu (RTK) k její dimerizaci a následné autofosforylaci tyrosinových zbytků. Tyto fosforylované zbytky jsou rozpoznány SH2 doménou proteinu Grb2, která je obklopena dvěma SH3 doménami. Grb2 následně váže výměnný faktor guaninových nukleotidů (guanine nucleotide exchange factor, GEF) SOS, čímž vzniká Grb2-SOS komplex. Tento komplex umožňuje aktivaci proteinu Ras

prostřednictvím výměny GDP za GTP. Aktivovaný Ras následně iniciuje MAP kinázovou kaskádu fosforylací kinázy Raf (MAP3K), která fosforyluje kinázu MEK (MAP2K), jež následně aktivuje kinázu ERK (Kináza regulovaná extracelulárním signálem, také známá jako MAPK). Aktivovaná ERK kináza může fosforylovat specifické proteiny v cytoplazmě nebo se translokovat do jádra, kde fosforyluje transkripční faktory regulující expresi genů, jako jsou *MYC*, *FOS*, *TAL*, *ETS1* (Guo et al., 2020; Wei & Liu, 2002).

Podobně jako v případě signalizace prostřednictvím PLC- γ dochází v důsledku konstitutivní aktivace NPM1::ALK k trvalé vazbě Grb2, tentokrát přes tyrosinový zbytek Y160 v C-terminální SH3 doméně. To vede k nepřetržité aktivaci MAPK kaskády, a tím i k podpoře buněčné proliferace, diferenciace, migrace a přežití (Riera et al., 2010).

Jedním z příkladů patologických procesů souvisejících s abnormální aktivací MAPK signalizační dráhy je regulace exprese antiapoptotického faktoru Bcl-xL a cyklin-dependentní kinázy 4 (CDK4) prostřednictvím ERK1/2. CDK4 hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu tím, že ve vazbě s cyklinem D fosforyluje retinoblastomový protein (Rb). Fosforylovaný Rb ztrácí schopnost vázat a inhibovat transkripční faktory rodiny E2F, což umožňuje progresi buňky z fáze G1 do fáze S, a tím podporuje nekontrolovanou proliferaci buněk (Ducray et al., 2019; Marzec et al., 2006).

2.2.5.5.3 PI3K/AKT/mTOR signalizační dráha

V rámci signalizační dráhy PI3K/AKT/mTOR u zdravých buněk dochází po aktivaci receptorové tyrosinkinázy (RTK) ligandem k její dimerizaci a autofosforylaci tyrosinových zbytků. Na tyto fosforylované zbytky se váže fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K), která prostřednictvím své katalytické podjednotky P110 α katalyzuje fosforylaci fosfatidylinositol-4,5-bifosfátu (PIP2) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP3). PIP3 následně slouží jako vazebné místo pro proteinkinázu B (AKT), která je aktivována fosforylací na T308 fosfoinositid-dependentní kinázou 1 (PDK1) a na S473 prostřednictvím komplexu mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). Aktivovaný AKT fosforyluje a tím inhibuje tuberin (TSC2), negativní regulátor proteinu Ras homolog obohacený v mozku (Rheb). Následně aktivovaný Rheb stimuluje komplex mTORC1, který reguluje syntézu proteinů a lipidů, podporuje buněčný růst, proliferaci a inhibuje autofagii (Paplomata & O'regan, 2014; Sun et al., 2020).

V případě aberantní aktivace této dráhy v souvislosti s NPM1::ALK dochází k interakci PI3K s autofosforylovanou ALK doménou fúzního proteinu prostřednictvím SH2

domény podjednotky p85 (R. Y. Bai et al., 2000). Následná konstitutivní aktivace PI3K/AKT/mTOR signální dráhy podporuje rozvoj nádorové transformace prostřednictvím několika mechanismů, přičemž klíčovou roli hrají proteinkinázy AKT a mTORC1 (Chiarle et al., 2008).

AKT podporuje buněčnou proliferaci inhibicí tumor supresoru p27 prostřednictvím jeho fosforylace, čímž dochází k zastavení inhibice cyklin-dependentních kináz (CDK), což umožňuje buňce přechod do S fáze buněčného cyklu (Rassidakis et al., 2005). Kromě toho AKT inhibuje expresi p27 i na transkripční úrovni fosforylací transkripčního faktoru FOXO3A, který kromě p27 reguluje transkripci apoptotických genů *BIM*, *PUMA* a *FASLG* (FasL). Inhibice FOXO3A tedy podporuje buněčnou proliferaci, ale současně brání apoptóze nádorových buněk (Gu et al., 2004; Ishii et al., 2023).

Aktivace mTORC1 vede k fosforylaci ribozomální S6 kinázy (p70S6K), která následně fosforyluje ribozomální protein S6 (S6RP). Tím se zvyšuje translace mRNA bohaté na polypyrimidinové sekvence, což podporuje syntézu proteinů nezbytných pro buněčný růst (Kurdi et al., 2016; Marzec et al., 2007). Dalším mechanismem, kterým mTORC1 stimuluje proteosyntézu, je fosforylace vazebného proteinu 1 eukaryotického iniciačního faktoru 4E (4E-BP1). V nefosforylovaném stavu 4E-BP1 váže eukaryotický iniciační faktor 4E (eIF4E), čímž blokuje jeho interakci s iniciačním komplexem eIF4F a inhibuje translaci. Po fosforylaci 4E-BP1 dochází k uvolnění eIF4E a sestavení iniciačního komplexu a zahájení k translaci mRNA, čehož nádorové buňky využívají k podpoře svého růstu a přežití (Vega et al., 2006).

2.2.5.5.4 JAK/STAT signalizační dráha

JAK/STAT signalizační dráha představuje klíčový mechanismus v procesu nádorové signalizace, přičemž v kontextu fúzního proteinu NPM1::ALK je její aktivace primárně spojena s transkripčním faktorem STAT3. Aktivace STAT3 v nádorových buňkách probíhá fosforylací na Y705 a S727, a to dvěma mechanismy: prostřednictvím kinázy JAK3 nebo přímou fosforylací fúzním proteinem NPM1::ALK (Zamo et al., 2002). Potom, co je STAT3 aktivován dochází k jeho dimerizaci STAT3 prostřednictvím interakcí mezi SH2 doménami a translokaci do jádra, kde ovlivňuje genovou expresi.

Jednou z klíčových funkcí STAT3 v kontextu onkogenní signalizace je upregulace exprese antiapoptotických genů, mezi něž patří *BCL2L1* (*Bcl-xL*), *BCL2A1*, *BCL2*, *MCL1* a *BIRC5* (survivin). Současně upreguluje geny podílející se na proliferaci nádorových buněk, jako jsou *CCND3* (cyklin D3), *CEBPB* (C/EBPβ), *MYC* a *ICOS*. Tímto způsobem STAT3

přispívá k podpoře přežívání a nekontrolované proliferace transformovaných buněk (Amin et al., 2004; Coluccia et al., 2004; Piva et al., 2006; Rust et al., 2005; Zamo et al., 2002; Q. Zhang et al., 2011). Dále se STAT3 podílí na zvýšení exprese genu pro CD30, což je jedním ze charakteristických znaků buněk ALK+ ALCL (Pearson et al., 2012).

Další významnou skupinou genů regulovaných STAT3 jsou ty, jejichž produkty modulují imunitní odpověď, čímž přispívají k úniku nádorových buněk před imunitním dohledem. Příkladem je gen *CD274* (PD-L1), ligand pro receptor programované buněčné smrti 1 (PD-1), jenž se nachází na povrchu T-lymfocytů a dalších imunitních buněk. Vazba PD-L1 na PD-1 vede k inhibici aktivace efektorových imunitních buněk, což umožňuje nádoru vyhnout se zničení imunitním systémem (Marzec et al., 2008). Kromě PD-L1 reguluje STAT3 také expresi dalších imunosupresivních molekul, včetně interleukinu 10 (IL-10), transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) a forkhead box P3 (FoxP3). Tyto proteiny jsou fyziologicky produkovány regulačními T-lymfocyty (Treg) za účelem kontroly nadměrné či nežádoucí imunitní odpovědi, avšak v kontextu nádorové biologie přispívají k potlačení imunitní odpovědi (Kasprzycka et al., 2006).

Dalším dějem, který je nezbytný pro rozvoj nádorového onemocnění, na němž se podílí STAT3 je neoangiogeneze. K tomu dochází díky indukci zvýšené exprese genu pro Hypoxií indukovaný faktor 1 α (HIF-1 α), jehož zvýšená intracelulární hladina signalizuje hypoxický stav. HIF-1 α dimerizuje s HIF-1 β , čímž se iniciuje transkripce genů zapojených do adaptace na nízkou dostupnost kyslíku, jako je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF). Výsledkem je stimulace angiogeneze a tvorba nových kapilár, které podporují růst nádoru (Marzec et al., 2011).

2.2.5.5.5 Epigenetická signalizace

Kromě zvyšování genové exprese se ale STAT3 může podílet na její downregulaci. K tomu využívá epigenetických mechanismů, konkrétně metylace DNA. K tomu STAT3 využívá zvýšení exprese určitých DNA metyltransferáz (DNMT), které metylují CpG motivy v promotorových oblastech genů. Tento děj má za následek zabránění nasedání transkripčních faktorů a umlčení exprese daného genu. Mezi geny, jejichž exprese je STAT3-dependentně umlčena, patří geny pro CD3 ϵ , Zap70, LAT a SLP76, které jsou klíčovými komponentami signalizační dráhy asociované s T-buněčným receptorem (TCR). Umlčení jejich exprese umožňuje ALK+ ALCL buňkám vyhnout se imunitní kontrole a ztratit T-buněčnou identitu, což nádorovým buňkám usnadňuje obejít konvenční signalizaci TCR, vyhnout se apoptóze a aktivovat alternativní signální dráhy podporující proliferaci a přežívání (Ambrogio et al.,

2009). Kromě uvedených genů byla identifikována řada dalších, jejichž exprese je potlačována hypermetylací promotorových oblastí řízenou STAT3. Mezi tyto patří geny kódující proteiny CD3, CD28, CTLA-4, LCK, GAD, SHP1, LYP, TCF7, GATA3, BCL11B a LEF1 (Hassler et al., 2016).

Vedle regulace genové exprese prostřednictvím STAT3-dependentní DNA metylace využívají nádorové buňky i další epigenetické mechanismy k podpoře onkogenese. Jedním z těchto mechanismů je regulace prostřednictvím nekódujících RNA, které lze rozdělit do několika podskupin (Ducray et al., 2019).

První podskupinou jsou mikroRNA (miRNA, miR), což jsou krátké nekódující RNA molekuly o délce přibližně 20 nukleotidů. Tyto molekuly hrají klíčovou roli v posttranskripční regulaci genové exprese tím, že se vážou na komplementární sekvence cílových mRNA, čímž inhibují jejich translaci a mohou indukovat jejich degradaci. MikroRNA se tak podílejí na regulaci široké škály biologických procesů, včetně buněčné proliferace, diferenciace, apoptózy a stresové odpovědi. Deregulace miRNA je často spojována s nádorovými onemocněními, přičemž k této deregulaci může dojít dvěma způsoby: downregulací tumor-supresorových miRNA nebo upregulací onkogenních miRNA (Hammond, 2015).

Na tuto oblast se zaměřil výzkumný tým Liu et al., který analyzoval změny v regulaci miRNA u ALCL, a následně porovnával expresní profily mezi ALK⁺ a ALK⁻ ALCL. Studie identifikovala sedm miRNA s deregulačním profilem specifickým pro ALK⁺ ALCL. Z těchto sedmi miRNA bylo pět upregulováno (miR-512-3p, miR-886-5p, miR-886-3p, miR-708 a miR-135b), zatímco dvě vykazovaly downregulaci (miR-146a a miR-155) (C. Liu et al., 2013).

Další studie s obdobným zaměřením identifikovala pět upregulovaných miRNA (miR-340, miR-203, miR-135b, miR-182, miR-183) a pět downregulovaných miRNA (miR-196b, miR-424, miR-503, miR-424*, miR-542-3p). Tato studie se rovněž zabývala miRNA regulovanými transkripčním faktorem C/EBP β . Analýza tří ALK⁺ ALCL buněčných linií (SUDHL-1, KiJK, Karpas 299) identifikovala 80 miRNA regulovaných C/EBP β , které byly exprimovány alespoň v jedné z těchto linií. Mezi nejvýrazněji upregulované ve všech analyzovaných liniích patřila miR-203, která reguluje supresor signalizace cytokinů-3 (SOCS-3), a miR-146b-5p, jež ovlivňuje signální dráhu TGF- β . Naopak downregulace byla pozorována u miR-181a a miR-181a*, které hrají významnou roli v regulaci citlivosti T-

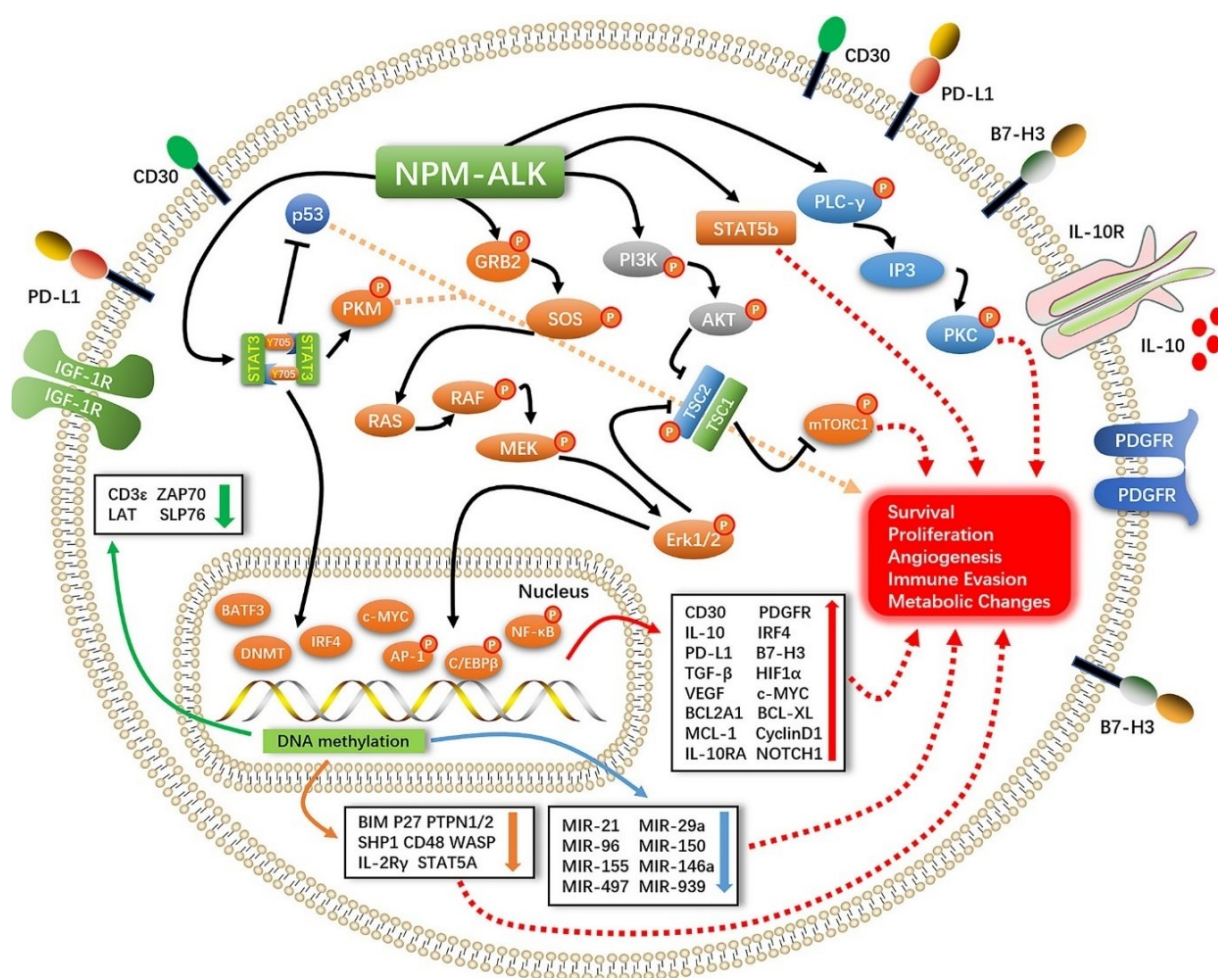
buněk na antigeny a v signalizaci zprostředkované TCR (Geraldo et al., 2011; Steinhilber et al., 2015).

Regulace genové exprese zprostředkovaná miRNA je rovněž modulována signální dráhou STAT3. Tímto mechanismem se zabývala výzkumná skupina Spaccarotella et al., která identifikovala 48 miRNA, jejichž exprese byla regulována indukovatelným knock-downem ALK a STAT3 v ALK⁺ ALCL. Mezi tyto miRNA patří klastrové rodiny miR-106a, miR-181, miR-193b, miR-143, miR-221, miR-223, miR-100 a miR-34a (Spaccarotella et al., 2014). Tento výzkum se dále zaměřil na klastr miR-17~92, což je onkogenní klastr sestávající ze šesti miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a a miR-92a). Tyto miRNA hrají zásadní roli v regulaci buněčné proliferace, apoptózy a buněčného cyklu. V rámci studie byla pozorována výrazná downregulace tohoto klastru po knock-downu STAT3, což naznačuje, že STAT3 přímo reguluje jeho expresi. Dále bylo prokázáno, že klastr miR-17~92 hraje klíčovou roli v záchraně nádorových buněk v situaci, kdy je STAT3 inhibován. Inhibice STAT3 vede ke zvýšené expresi proapoptotických proteinů BIM a TGFβRII, což následně indukuje apoptózu nádorových buněk. Klastr miR-17~92 působí jako inhibiční faktor vůči BIM a TGFβRII na úrovni transkriptu, a tím může suplovat funkci STAT3 v prevenci apoptotických procesů (Spaccarotella et al., 2014).

Další významnou skupinou nekódujících RNA, které se podílejí na regulaci genové exprese a onkogeneze, jsou dlouhé nekódující RNA (lncRNA). Tyto RNA molekuly, které jsou delší než 200 nukleotidů, se nepřekládají do proteinů, hrají ale zásadní roli v regulaci genové exprese na různých úrovních buněčných procesů, včetně remodelace chromatinu, transkripční a posttranskripční regulaci. LncRNA mohou fungovat jako scaffoldy, transportní molekuly nebo regulátory epigenetických modifikací, například prostřednictvím interakce s histonovými modifikátory. Kromě těchto regulačních funkcí byly lncRNA často spojovány s patogenezí a progresí nádorových onemocnění. Některé z nich vykazují onkogenní aktivitu, zatímco jiné plní roli nádorového supresoru, čímž ovlivňují klíčové buněčné dráhy související s růstem a přežitím nádorových buněk (Bridges et al., 2021).

Regulace dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) u pacientů s ALK⁺ ALCL byla předmětem studie výzkumné skupiny Chung et al. Tato studie identifikovala 51 lncRNA s diferenciální expresí ve srovnání se zdravou tkání, přičemž 20 lncRNA vykazovalo upregulaci a 31 downregulaci exprese. Mezi identifikovanými lncRNA byla zvláštní pozornost věnována LINC01013, která byla v buňkách ALK⁺ ALCL výrazně upregulována. Experimentální analýza ukázala, že LINC01013 hraje klíčovou roli v nádorové invazivitě. Knockdown této

lncRNA vedl k signifikantnímu potlačení invazivního potenciálu nádorových buněk, zatímco její zvýšená exprese invazivitu naopak podpořila. Mechanismus, kterým LINC01013 podporuje nádorovou invazi, byl spojen s aktivací proteinů zapojených do epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT). Konkrétně bylo zjištěno, že prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru Snail dochází ke zvýšení exprese fibronektinu, což vede ke zvýšené adhezi a migraci nádorových buněk (Chung et al., 2017).



Obrázek 5 Patogeneze způsobená fúzním proteinem NPM1::ALK (Y. Wang et al., 2022)

2.2.5.6 Využití ALK při diagnostice ALK+ ALCL

Expresce aberantního genu *ALK* u ALK+ ALCL, stejně jako u dalších malignit, je v současnosti využívána jako diagnostický marker v rámci imunohistochemie (IHC) pro odlišení od jiných CD30-pozitivních nádorových onemocnění. K tomuto účelu je nejčastěji využívána myší monoklonální protilátka ALK1 (CD246). Vedle ní je rovněž široce používána

novější králičí monoklonální protilátka D5F3, u níž byla prokázána vyšší intenzita barvení a vyšší procento pozitivních vzorků s ALK-exprimujícími buňkami ve srovnání s protilátkou ALK1. (Martin et al., 2022).

2.2.6 Další markery specifické pro ALCL

Kromě exprese *CD30* a přítomnosti translokovaného genu *ALK*, které představují klíčové diagnostické znaky ALK-pozitivního anaplastického velkobuněčného lymfomu (ALK+ ALCL), vykazují tyto nádory také další charakteristické imunohistochemické znaky. Ve většině případů bývá prokázána pozitivita na epiteliální membránový antigen (EMA), jehož přítomnost napomáhá k odlišení od jiných typů lymfomů, které tuto expresi obvykle nevykazují. K diagnostice se rovněž využívají další imunohistochemické markery, jejichž exprese je méně častá. Mezi tyto markery patří aktivační molekuly T-lymfocytů *CD2*, *CD5* a *CD4* a také cytotoxické proteiny *TIA1*, *Granzym B* a *Perforin*. V některých případech je dále detekována exprese markerů *CD45*, *CD45RO* a *CD25*. Naopak exprese *CD3*, *CD8* a *TCR βF1* bývá u pacientů s ALK+ ALCL zpravidla negativní (Montes-Mojarro et al., 2018).

2.2.7 Léčba ALK+ ALCL

2.2.7.1 Standartní léčba

V současné době je ALK+ ALCL primárně léčen kombinovanou chemoterapií. Pro terapii tohoto onemocnění existuje několik chemoterapeutických režimů, přičemž nejčastěji používaným je režim CHOP. Tento protokol představuje standardní léčebný přístup pro široké spektrum non-Hodgkinových lymfomů a zahrnuje kombinaci čtyř léčiv: Cyklofosfamidu, Doxorubicinu, Vinkristinu a Prednisonu (Barta et al., 2023).

Cyklofosfamid je alkylační cytostatikum, které se v játrech metabolizuje na aktivní formu chlorethylfosforamid (fosforamidový yperit). Tento metabolit se v nádorových buňkách váže na guaninové báze DNA, čímž indukuje nevratný vnitro- a mezivláknový crosslinking DNA. Tato modifikace narušuje procesy replikace a transkripce, což vede k aktivaci buněčných opravných mechanismů a následné apoptóze (Ahlmann & Hempel, 2016).

Doxorubicin působí několika mechanismy. Primárně interkaluje mezi dusíkaté báze DNA, čímž blokuje transkripci. Současně inhibuje aktivitu topoizomerázy II, která za fyziologických podmínek redukuje torzní napětí DNA během replikace. Její inhibice vede k dvojřetězcovým zlomům DNA, které při neúspěšné opravě spouští apoptózu. Dalším mechanismem účinku je generace reaktivních forem kyslíku (ROS), což způsobuje oxidativní stres a další indukci buněčné smrti (Zhu et al., 2016).

Vinkristin je mitotický inhibitor, který se váže na tubulin a blokuje polymerizaci mikrotubulů, což brání tvorbě mitotického vřeténka. Neschopnost správného rozdělení chromosomů v metafázi mitózy vede k aktivaci kontrolního bodu buněčného cyklu a následně k apoptóze (Paul et al., 2023).

Prednison je syntetický glukokortikoid, jehož funkcí je snížení prozánětlivé imunitní reakce, potlačením prozánětlivých cytokinů, jakými jsou například IL-1, IL-6, a TNF- α . Toho dosáhnou vazbou na glukokortikoidový receptor, který se po navázání ligandu přemístí do jádra, kde slouží jako transkripční faktor pro tyto cytokiny. V případě Prednisonu zároveň tento transkripční faktor spouští apoptózu, čímž aktivně pomáhá potlačit nádorové onemocnění (Choi et al., 2023).

Kromě tohoto standardně používaného terapeutického režimu existují i další často aplikované chemoterapeutické protokoly, které vycházejí z CHOP terapie. Jednou z alternativ je režim CHOEP, který k základním čtyřem složkám přidává etoposid (Barta et al., 2023). Etoposid je cytostatikum, jehož mechanismus účinku, podobně jako u doxorubicinu, spočívá v inhibici topoizomerázy II. V tomto případě dochází k zabránění ligace rozštěpené DNA, přičemž topoizomeráza II nemůže oddisociovat od navázané DNA, což vede ke kumulaci dvouřetězcových zlomů DNA a následné aktivaci apoptotických signálních drah (Montecucco et al., 2015).

V případech rezistence na terapii nebo relapsu onemocnění se kromě chemoterapie často přistupuje k transplantaci hematopoetických kmenových buněk. U ALK⁺ ALCL se využívají autologní i alogenní transplantace, přičemž volba metody závisí na věku pacienta a léčebném kontextu, tedy zda se jedná o součást primární terapie nebo léčbu relapsu (Ferreri et al., 2012). Při autologní transplantaci jsou pacientovi podány jeho vlastní kmenové buňky, které byly odebrány před podáním vysokodávkované chemoterapie určené k eliminaci nádorových buněk (Deconinck et al., 2000). Oproti tomu alogenní transplantace spočívá v podání kmenových buněk od dárce, kterým může být kompatibilní sourozenec nebo nepříbuzný dárce z registru. Tento přístup je preferován zejména u dětských pacientů s relabujícím onemocněním (Woessmann et al., 2006).

2.2.7.2 Cílená terapie

Kromě již zmíněných chemoterapeutických režimů, které se uplatňují v rámci primární léčby, se v terapii ALK⁺ ALCL využívá také cílená léčba, zaměřená na molekuly specifické pro nádorové buňky. V případě ALK⁺ ALCL se cílená terapie soustředí primárně

na ALK doménu fúzního genu *NPM1::ALK*, která je klíčová pro aberantní nádorovou signalizaci. V současné době je v klinické praxi využíván Krizotinib, což je ATP-kompetitivní inhibitor tyrosinkináz, selektivně zaměřený nejen na ALK, ale také na MET a ROS1. Mechanismus účinku Krizotinibu spočívá ve vazbě na ATP-vazebné místo ALK, čímž dochází k její inhibici. Tento přípravek se v současnosti používá především u pediatrických pacientů s relabujícím ALK+ ALCL. Mezi hlavní výhody této terapie patří nízká míra nespecifických nežádoucích účinků a relativně mírný toxický profil. Hlavním limitem léčby je však vznik rezistence, ke které dochází v důsledku mutací v ATP-vazebném místě ALK, což vede k snížené účinnosti krizotinibu (Hu & Feldman, 2020; Rindone et al., 2023).

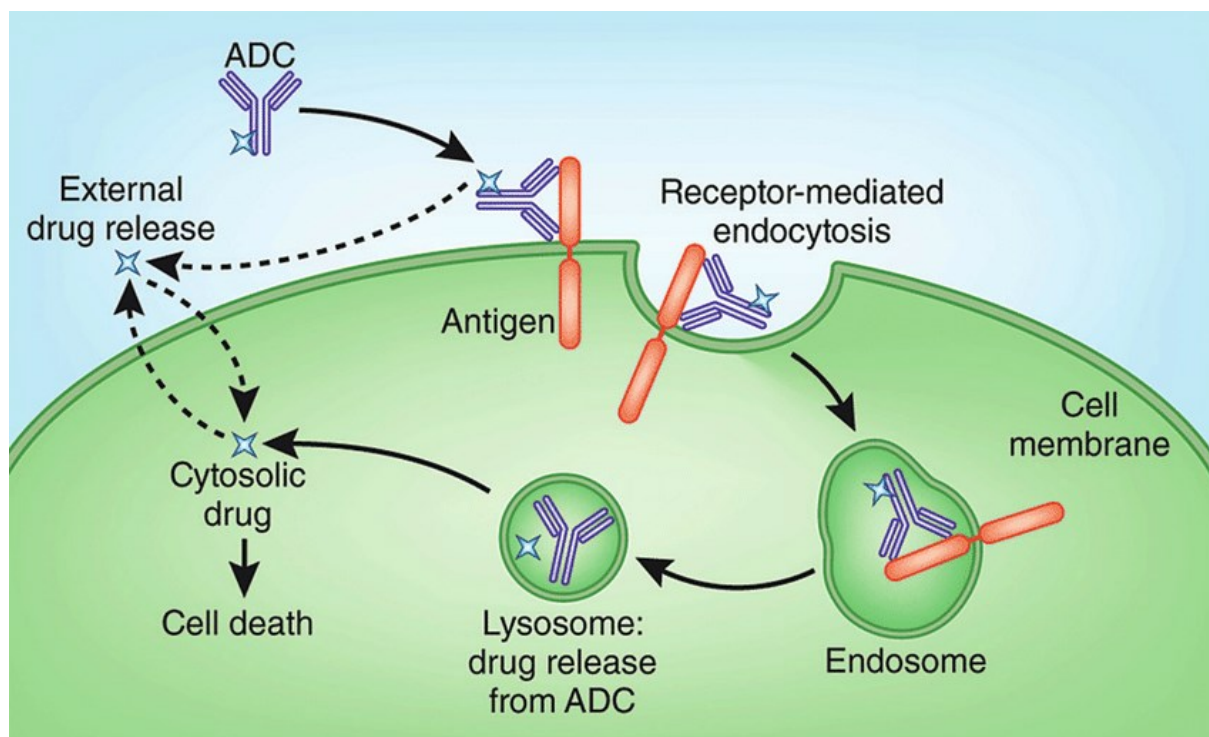
Z tohoto důvodu se zkoumají a klinicky testují i další inhibitory ALK, které se uplatňují u jiných malignit s mutacemi v genu *ALK*. Mezi tyto přípravky se řadí ALK inhibitory druhé generace Ceritinib, Alectinib a Brigatinib a také ALK inhibitor třetí generace Lorlatinib. Dosavadní preklinické a klinické studie naznačují, že tyto látky by mohly překonat rezistenci vyvolanou mutacemi v genu *ALK*, avšak jejich široké klinické využití v léčbě ALK+ ALCL je stále předmětem probíhajících klinických či preklinických výzkumů (Prokoph et al., 2023; Ripamonti et al., 2023; Subbiah et al., 2021).

Cílená terapie ALK+ ALCL může být dále zaměřena na zvýšenou expresi povrchového receptoru CD30. Tento cíl využívá léčivo Brentuximab vedotin (BV, známý také jako SGN-35 či cAC10), což je konjugát protilátky a léčiva (ADC). BV je tvořen monoklonální protilátkou SGN-30, k níž je připojen monomethyl auristatin E (MMAE) (Deng et al., 2013). SGN-30 vznikla na základě variabilní oblasti protilátky AC10, která prokázala schopnost inhibovat buněčné linie Hodgkinova lymfomu in vitro. Tato protilátka je spojena s lidským těžkým řetězcem $\gamma 1$ a konstantní oblastí lehkého řetězce κ (Wahl et al., 2002). Funkcí MMAE je inhibice polymerace mikrotubulů, čímž narušuje mitotické dělení a vede k buněčné smrti (Deng et al., 2013). Brentuximab vedotin vykazuje dva hlavní mechanismy účinku proti nádorovým buňkám, které jsou podmíněny přítomností valin-citrulinového dipeptidového linkeru mezi SGN-30 a MMAE. Tento linker je specificky štěpen buněčnými proteázami, zejména katepsinem B (Deng et al., 2013; Jacobsen et al., 2015).

První mechanismus účinku (znázorněný na obrázku nepřerušovanými šipkami, Obrázek 6) spočívá v navázání BV na CD30 prostřednictvím SGN-30. Po vazbě dochází ke klatrinem zprostředkované endocytóze, která zajišťuje internalizaci BV do lysozomů (Kung Sutherland et al., 2006). V lysozomálním prostředí dochází ke štěpení linkeru, čímž se uvolňuje MMAE do cytosolu. Následně se MMAE váže na tubulin a inhibuje polymerizaci

mikrotubulů, což vede k zástavě buněčného cyklu a indukci apoptózy CD30-pozitivních buněk (Katz et al., 2011).

Kromě primárního mechanismu účinku BV existuje i sekundární mechanismus (znázorněný na obrázku přerušovanými šipkami, Obrázek 6), který umožňuje cytotoxický účinek MMAE bez nutnosti vazby na receptor CD30. Tento proces je podmíněn schopností volného MMAE pasivně difundovat přes cytoplazmatickou membránu. K tomu, aby mohl tento mechanismus probíhat, musí nejprve dojít ke štěpení linkeru mezi MMAE a SGN-30. K tomuto štěpení dochází intracelulárně v lysozomu, kde kromě inhibice polymerace mikrotubulů dochází rovněž k difuzi volného MMAE z nádorové buňky do okolního mikroprostředí. Vedle intracelulárního štěpení může k uvolnění MMAE docházet také v extracelulárním prostoru působením proteáz produkovaných nádorovými buňkami a s nádory asociovanými makrofágy (TAMs), bez nutnosti vstupu BV do buňky. Uvolněné MMAE pak může difundovat do okolních buněk, kde následně inhibuje polymerizaci mikrotubulů a indukuje apoptózu, čímž přispívá k dalšímu potlačení nádorového růstu (Staudacher & Brown, 2017).



Obrázek 6 Mechanismus účinku léku Brentuximab vedotinu (ADC = antibody-drug conjugate) (Novakovic, 2015)

Tento přípravek je pacientům často podáván v rámci chemoterapeutického přístupu BvCHP, u kterého je Vinkristin nahrazen Brentuximab vedotinem (Barta et al., 2023).

2.3 Diagnostické metody

2.3.1 Minimální reziduální nemoc

Jak již bylo uvedeno, i přes relativně příznivou prognózu pacientů s ALK+ ALCL, u nichž se OSR pohybuje mezi 70 a 80 %, dochází u významného podílu nemocných k relapsu onemocnění (Xing & Feldman, 2015).

Minimální reziduální nemoc (MRN) označuje přítomnost malého množství reziduálních nádorových buněk v biologických vzorcích pacientů, zpravidla odebraných z periferní krve nebo kostní dřeně během průběhu terapie (Kalinová, 2013). U pacientů s některými hematologickými malignitami, včetně ALK+ ALCL, byla přítomnost MRN asociována se zvýšeným rizikem relapsu, což je hlavním důvodem, proč je nezbytné tyto pacienty pravidelně monitorovat za účelem včasné detekce a prevence opětovného rozvoje onemocnění (Kalinová, 2013).

Ke sledování MRN se rutinně využívají metody průtokové cytometrie, kvantitativní či digitální PCR, případně sekvenování nové generace (next-generation sequencing, NGS). V kontextu ALK+ ALCL jsou tyto techniky aplikovány především ke sledování exprese fúzního transkriptu *NPM1::ALK* či jiných méně častých fúzních variant vzniklých translokací genu *ALK*. Jako výchozí materiál je nejčastěji používána cDNA syntetizovaná reverzní transkripcí z mRNA izolované ze vzorků periferní krve nebo kostní dřeně (Kalinová, 2013; Mussolin et al., 2021).

2.3.2 Kvantitativní PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR), označovaná též jako real-time PCR, představuje molekulárně-biologickou metodu, která na rozdíl od konvenční PCR umožňuje sledovat průběh amplifikace cílové DNA v reálném čase. Tohoto je dosaženo buď využitím nespecifických fluorescenčních barviv, jako je SYBR Green, která se vážou na dvouvláknovou DNA, nebo použitím specifických fluorescenčních sond, například TaqMan sond, jež hybridizují s konkrétní sekvencí cílové DNA. Fluorescenční signál generovaný během každého amplifikačního cyklu je následně detekován a jeho intenzita koreluje s množstvím vzniklého PCR produktu (Harshitha & Arunraj, 2021).

Naměřená data lze analyzovat dvěma základními způsoby. Prvním přístupem je relativní kvantifikace, v níž je exprese cílové sekvence normalizována vůči referenčnímu genu. Referenční geny, často tzv. *housekeeping* geny, vykazují stabilní expresi napříč různými

typy buněk a jsou esenciální pro udržení základních buněčných funkcí. Druhou metodou je absolutní kvantifikace, která umožňuje stanovit přesný počet kopií cílové DNA ve vzorku. Tohoto cíle je dosaženo pomocí standardní křivky získané amplifikací známých koncentrací sledované DNA sekvence (Harshitha & Arunraj, 2021; Joshi et al., 2022).

2.3.3 Digitální PCR

Digitální PCR (dPCR) představuje podtyp PCR metody, který umožňuje absolutní kvantifikaci vzorku nukleové kyseliny, a to bez nutnosti využití standardní křivky. Na rozdíl od jiných metod PCR, kde probíhá reakce v jedné zkumavce, je zde reakce rozdělena na velké množství dílčích reakcí. V závislosti na specifickém podtypu dPCR se reakce provádí buď v oddělených nanojamkách, nebo v případě *droplet* dPCR v nanokapkách. Při správném provedení se díky tomuto rozdělení tedy v každé nanojamce či nanokapce nachází pouze buď jedna anebo žádná molekula nukleové kyseliny, která slouží jako templát pro následnou amplifikaci (Mao et al., 2019).

Na rozdíl od qPCR není v dPCR nutné kontinuálně měřit fluorescenční signál během celé reakce a sledovat jeho změny. Měření fluorescenčního signálu je nezbytné pouze na konci reakce. Díky analýze fluorescenčních signálů se stanoví počet nanojamek nebo nanokapek, v nichž došlo k PCR reakci, což odpovídá počátečnímu množství sledovaných molekul nukleových kyselin. Další výhodou dPCR je nižší pravděpodobnost inhibice reakce, protože prostorové rozdělení reakcí zároveň snižuje pravděpodobnost, že se v dané nanojamce nebo nanokapce bude nacházet také inhibitor, který by mohl reakci potlačit (Quan et al., 2018).

3 Cíle práce

1. Zavést novou metodu dPCR využívající digital LightCycler (Roche) pro detekci minimální reziduální nemoci (MRN) u pacientů s ALK+ ALCL, u kterých dochází ke vzniku fúzní mutace *NPM1::ALK*.
2. Porovnat vzniklá data s aktuálně používanou qPCR.
3. Navrhnout a otestovat primery a sondu pro fúzní gen *TPM3::ALK*. Tato sonda bude sloužit jako součást dalších výzkumů a také při klinických vyšetřeních v případě diagnostiky dalšího pacienta s touto vzácnou alterací.
4. Otestovat, zda hladina minimální MRN u pacienta koreluje s jeho klinickým stavem ze vzorků odebraných v průběhu léčby. Dle hypotézy by měla změna MRN korelovat s klinickým stavem pacienta, tedy zvýšení hladiny fúzního genu by se mělo odrážet ve změně klinického stavu – relapsu onemocnění. Zároveň v rámci této části vyvrátit dezinformaci, že při sledování MRN za pomoci dPCR není nutné normalizovat vzorek k referenčnímu genu.
5. Hledat variabilitu v expresi genu *ALK* a dalších genů, které by mohly mít případný význam pro rozvoj a průběh ALK+ ALCL u pacientů s různými fúzními geny jako jsou: *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*.
6. Porovnat odlišnosti v citlivosti dPCR u vzorků periferní krve a kostní dřeně odebraných ve stejném čase u pacientů s ALK+ ALCL.

4 Metody

4.1 Použité primery a sondy

Tabulka 2 Primery použité při qPCR

Označení primeru či sondy	koncentrace	Sekvence (5'-3')
ALK 37 L	10pM/ul	TGG AGT TTG TCA CCA GTG GA
ALK 37 R	10pM/ul	GCC AGC ACT GAG TCA TTA TCC
ALK sonda	4pM/ul	/56-FAM/CAA GAA CTG CCC TGG GCC/36-TAMSp/
B2M probe	5pM/ul	/56-FAM/CTT CTG TTC CTC GCA GAC CTC CAG CAT/36-TAMSp/
B2M-S	10pM/ul	TGA CTT TGT CAC AGC CCA AGA TA
B2M-A	10pM/ul	AAT CCA AAT GCG GCA TCT TC

Tabulka 3 Primery použité při dPCR

Označení primeru či sondy	koncentrace	Sekvence (5'-3')
NPM/ALK F	10pM/ul	CAG TGC ATA TTA GTG GAC AGC ACT TAG
NPM/ALK R	10pM/ul	TGA TGG TCG AGG TGC GGA
NPM/ALK Probe	10pM/ul	/56-FAM/CAC CAG GAG /ZEN/ CTG CAA GCC ATG CA/3/ABkFQ
Primer ABL F	10pM/ul	CAA CAC TGC TTC TGA TGG CAA
Primer ABL R	10pM/ul	CGG CCA CCG TTG AAT GAT
ABL Probe	4pM/ul	5HEX/CAA CAC CCT /ZEN/ GGC CGA GTT GGT TCA T/3/ABkFQ

Tabulka 4 Primery použité při Sangerovu sekvenování

Označení primeru či sondy	koncentrace	Sekvence (5'-3')
Primer ALK3455R	50pM/ul	AGG TCT TGC CAG CAA AGC AGT AGT T
Primer TPM3/249F	50pM/ul	ACT GAT AAA CCC AAG GAG GCA GAG A

Tabulka 5 Mnou navržené primery použité při dPCR (fúzní gen TPM3::ALK)

Označení primeru či sondy	koncentrace	Sekvence (5'-3')
Primer ALK	10pM/ul	GTC GGT CAT GAT GGT CGA GG
Primer TPM3	10pM/ul	GAT CGG TAG CCA AGC TGG AA
TPM3/ALK sonda	4pM/ul	/56-FAM/GTG TAC CGC /ZEN/ CGG AAG CAC CA/3IABkFQ/

4.2 Použité vzorky

V rámci výzkumu bylo analyzováno 143 vzorků RNA odebraných 16 pacientům s diagnózou ALK+ ALCL, u nichž došlo k translokaci vedoucí k tvorbě fúzního genu *NPM1::ALK*. Tyto vzorky pocházejí z diagnostických a prognostických vyšetření prováděných během léčby ve Fakultní nemocnici v Motole. Jako materiál pro izolaci RNA byla v 87 případech použita periferní krev, v 46 případech vzorky kostní dřeně a v 10 případech vzorky odebrané přímo z primárního tumoru. Tento nízký počet vzorků z primárního tumoru je způsoben tím, že byly odebírány především při primární diagnóze onemocnění, zatímco v pozdějších fázích léčby, tedy při monitorování MRN nebo po skončení primární terapie, se pro sledování možného relapsu onemocnění primárně využívají vzorky periferní krve a kostní dřeně. Vzhledem k nízké incidenci onemocnění ALK+ ALCL bylo pro objektivní porovnání metod qPCR nezbytné využít vzorky sesbírané v dlouhodobém časovém horizontu. Vzorky použité v této odborné práci byly sesbírány v období mezi 19. únorem 2001 a 5. listopadem 2024.

Mezi pacienty bylo 12 chlapců a 4 dívky, přičemž věk pacientů se při rozvoji onemocnění pohyboval v rozmezí 3 a 16,5. V následující tabulce jsou uvedeny informace k jednotlivým pacientům včetně doby od ukončení léčby. Tento údaj se vztahoval k době sepisování diplomové práce, tedy březen 2025. V případě pacientů pocházejících ze Slovenska tento údaj nebyl dostupný a z tohoto důvodu zde není u těchto pacientů uveden.

Tabulka 6 Podrobnější informace týkající se pacientů s fúzním genem *NPM1::ALK*, jejichž vzorky byly testovány v rámci této diplomové práce

Označení pacienta	Věk při rozvoji onemocnění	Stav dle kontroly po skončení léčby	Doba od ukončení léčby v době zpracování diplomové práce
Pacient č.1	14,5	Kompletní odpověď	1 rok a 7 měsíců
Pacient č.2	14	Kompletní odpověď	1 rok a 9 měsíců
Pacient č.3	13	Kompletní odpověď	
Pacient č.4	15	Kompletní odpověď	3 roky a 8 měsíců
Pacient č.5	8	Kompletní odpověď	3 roky a 10 měsíců
Pacient č.6	10,5	Ztracený ze sledování	
Pacient č.7	5,75	Kompletní odpověď	4 roky
Pacient č.8	12,25	Kompletní	4 roky a 3 měsíce

		odpověď	
Pacient č.9	11	Kompletní odpověď	
Pacient č.10	3	Kompletní odpověď	
Pacient č.11	5,25	Kompletní odpověď	
Pacient č.12	9,5	Kompletní odpověď	
Pacient č.13	16,5	Ztracený ze sledování	
Pacient č.14	4	Kompletní odpověď	23 let a 2 měsíce
Pacient č.15	4	úmrtí	Úmrtí na progresi onemocnění 3 roky od diagnózy
Pacient č.16	12	recidivující	Probíhající léčba

Kromě těchto vzorků byly testovány 2 vzorky cDNA 2 pacientům s diagnózou ALK+ ALCL, u nichž došlo k přestavbě vedoucí k vytvoření fúzního genu *TPM3::ALK*. První vzorek byl odebrán chlapci ve věku 6, druhý vzorek dívce, které bylo v době odběru 11 let. V obou případech se jednalo o vzorky mRNA izolované z primárního nádoru. Tyto vzorky byly zvoleny na základě experimentálního záměru, jehož cílem bylo vytvoření sondy, která by mohla mít využití při diagnostice pacientů s touto přestavbou. Vzorek z primárního tumoru byl vybrán vzhledem k vyššímu počtu kopií mRNA s detekovatelným fúzním genem, což jej činí vhodnějším materiálem pro tento experiment ve srovnání s periferní krví nebo kostní dření.

Dále byl testován jeden vzorek cDNA z primárního tumoru pacientky s ALK+ ALCL, s fúzním genem *TPM4::ALK*. Tento vzorek byl použit k otestování, zda mohou být primery a sonda navržené pro sledování exprese *TPM3::ALK* za pomoci dPCR použity také při testování exprese *TPM4::ALK*.

4.3 Izolace nukleové kyseliny

Vzhledem k použití vzorků RNA sbíraných v dlouhodobém časovém horizontu jsem osobně izoloval vzorky pouze od jednoho pacienta (Pacient č. 16), který byl v průběhu studie stále léčen ve Fakultní nemocnici v Motole. Všechny ostatní vzorky mRNA byly izolovány před zahájením praktické části této výzkumné práce.

Při izolaci RNA jsem použil dvě různé metody izolace, které využívaly odlišné laboratorní soupravy. Tento přístup byl odůvodněn skutečností, že vzorky RNA použitých v

rámci výzkumu pocházely ze tří odlišných zdrojů – primárního tumoru, kostní dřeně a periferní krve, přičemž pro izolaci RNA z kostní dřeně a periferní krve byl použit stejný kit.

Je také vhodné zmínit, že během procesu izolace RNA byla zároveň izolována i DNA z patientských vzorků. Tato DNA však nebyla v rámci tohoto výzkumu dále využita, a proto není podrobně popsán proces její izolace.

4.3.1 Izolace RNA z parařinových řezů

První metodou, kterou jsem využil, byla izolace RNA z parařinových řezů, aplikovaná pro získání RNA z primárního tumoru. K tomuto účelu byl použit High Pure FFPET RNA Isolation Kit od společnosti Roche, který je určen pro izolaci RNA z formalínem fixovaných a parařinem zalitých tkání (FFPET).

Před samotnou izolací RNA jsem u všech vzorků provedl deparařinizaci. Nejprve jsem k parařinovým řezům umístěným v 1,5ml zkumavkách přidal 800 µl xylenu a zkumavky jsem následně vortexoval. Poté jsem do každé zkumavky přidal 400 µl 100 % ethanolu a znovu je vortexoval. Po promíchání jsem zkumavky vložil do centrifugy Centrifuge 5430R od společnosti Eppendorf a centrifugoval po dobu 2 minut při rychlosti 14 000 otáček za minutu (RPM). Po ukončení centrifugace jsem opatrně slil supernatant tak, aby nedošlo k narušení pelety, přičemž zbylé kapky supernatantu jsem odstranil pomocí pipetovací špičky. Ústí zkumavek jsem následně osušil sterilním čtvercem buničiny a do každé zkumavky jsem přidal 1 ml 100 % ethanolu. Zkumavky s ethanolem jsem důkladně vortexoval a poté znovu centrifugoval po dobu 2 minut při 14 000 RPM. Následně jsem opět opatrně odstranil supernatant tak, aby nedošlo k narušení pelety, a poslední zbytky supernatantu jsem odstranil pomocí špičky. Po odstranění supernatantu jsem nechal peletu vyschnout v termobloku po dobu 15 minut při teplotě 55 °C. Po vysušení byla fáze deparařinizace dokončena a takto připravené zkumavky s peletou jsem dále využil při izolaci molekul RNA.

V rámci samotné izolace jsem k peletám získaným po deparařinizaci přidal 100 µl RNA Tissue Lysis Bufferu, 16 µl 10 % roztoku dodecylsiranu sodného (SDS) a 40 µl proteinázy K. Tuto směs reagentů jsem důkladně vortexoval, krátce centrifugoval a nechal vzorky inkubovat po dobu 30 minut v termobloku při teplotě 85 °C. Během inkubace jsem vzorky několikrát promíchal vortexováním. Po ukončení inkubace jsem vzorky opět krátce centrifugoval, a pokud byly ve vzorcích stále přítomny viditelné částice, jsem prodloužil dobu inkubace o dalších 10 minut, dokud nebyly všechny lyzáty zcela čiré.

Následně jsem do každé zkumavky přidal 325 µl RNA Binding Bufferu a 325 µl 100 % ethanolu. Obsah zkumavek jsem důkladně promíchal vortexováním, krátce centrifugoval a poté celý objem přepipetoval do horních částí předem připravených a popsanych izolačních kolon obsahujících filtrační membránu. Kolony jsem vložil do centrifugy a centrifugoval je po dobu 30 sekund při rychlosti 8000 otáček za minutu (RPM). Následně jsem spodní odpadní části kolon vyměnil za nové a provedl druhou centrifugaci po dobu 2 minut při 14 000 RPM.

Po dokončení centrifugace jsem opět vyměnil spodní části kolon, přidal ke každému vzorku do horní části kolony s filtrem 100 µl DNase working solution a nechal je inkubovat po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace jsem do horní části kolon přidal 500 µl Wash Bufferu I a centrifugoval kolony 20 sekund při 8000 RPM. Vzniklý odpad ve spodních částech kolon jsem odstranil. Následně jsem do horní části každé kolony přidal 500 µl Wash Bufferu II a kolony opět centrifugoval 20 sekund při 8000 RPM. Tento krok, tedy přidání 500 µl Wash Bufferu II, centrifugace a odstranění odpadu, jsem zopakoval ještě jednou. Poté jsem kolony centrifugoval po dobu 2 minut při 14 000 RPM.

Horní části kolon s filtry jsem následně přenesl do nových, předem popsanych 1,5ml zkumavek, přidal jsem k nim 25 µl RNA Elution Bufferu a nechal je inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem zkumavky s kolonami centrifugoval 1 minutu při rychlosti 8000 RPM. Po ukončení centrifugace jsem odstranil horní části kolon s filtrem a zkumavky s vyizolovanou RNA jsem uložil do mrazáku nastaveného na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byly uchovávány až do jejich dalšího využití v následujících experimentech této výzkumné práce.

4.3.2 Trizolová izolace RNA z mražené tkáně nebo buněk

Druhou metodou, kterou jsem použil při izolaci, byla trizolová izolace RNA ze zamražených buněk. Tuto metodu jsem aplikoval při izolaci RNA ze vzorků kostní dřeně a periferní krve. Na rozdíl od předchozí metody jsem při tomto postupu nepoužil žádný komerčně dostupný izolační kit.

Před samotnou izolací RNA jsem předchladil centrifugu na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. V rámci izolačního postupu jsem ke každému vzorku mraženého biologického materiálu, uloženému v 1,5ml zkumavce, přidal 1 ml Trizolu. Zkumavky jsem důkladně promíchal pomocí vortexu a nechal je inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace jsem ke každému vzorku přidal 200 µl chloroformu, zkumavky následně ručně třpal po dobu 10 sekund a poté dalších 10 sekund vortexoval, dokud nevznikla homogenní mléčně růžová suspenze. Následně jsem

zkumavky nechal inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby jsem je vložil do předchlazené centrifugy a centrifugoval po dobu 15 minut při rychlosti 11 600 RPM.

Po dokončení centrifugace jsem do předem připravených a popsanych 1,5ml zkumavek opatrně odebíral horní, průhlednou vodnou fázi, a to postupně po 100 μ l. Po odebrání co největšího množství čisté vodné fáze, které bylo možné získat bez rizika kontaminace, jsem zbylou vodnou fázi odstranil a zlikvidoval jako infekční odpad. Mezi manipulací s jednotlivými vzorky jsem měnil rukavice, abych minimalizoval riziko křížové kontaminace. Zbylá část obsahu zkumavky, tedy růžová vodná fáze a bílá DNA sraženina na dně, byla dále zpracována podle protokolu pro trizolovou izolaci DNA z mražené tkáně.

Do zkumavek obsahujících průhlednou vodnou fázi s RNA jsem následně přidal 500 μ l isopropanolu, vzorky jemně promíchal převrácením zkumavky a nechal je inkubovat 10 minut při pokojové teplotě za účelem precipitace RNA. Poté jsem zkumavky umístil do předchlazené centrifugy a centrifugoval je 10 minut při rychlosti 11 600 RPM. Po centrifugaci jsem opatrně slil supernatant tak, aby nedošlo k narušení RNA pelety, a ústí zkumavky osušil sterilním vyklávaným čtvercem buničiny. Do každé zkumavky jsem přidal 1 ml 75 % ethanolu, vzorky opět vložil do vychlazené centrifugy a centrifugoval je 5 minut při rychlosti 9200 RPM. Po dokončení centrifugace jsem znovu odstranil supernatant, ústí zkumavky osušil sterilním čtvercem buničiny a nechal zkumavky otevřené dnem vzhůru po dobu 15 minut, aby došlo k úplnému odpaření zbytků ethanolu. V případě, že se i po uplynutí tohoto časového intervalu ve zkumavkách nacházeli zbytky ethanolu, tak jsem je odstranil za pomoci špičky.

Do každé zkumavky jsem následně přidal 40 μ l sterilní vody a vzorky inkuboval po dobu 10 minut v termobloku předehřátém na 60 °C za účelem rozpuštění RNA pelety. Takto připravené vzorky s vyizolovanou RNA jsem uložil do mrazicího boxu nastaveného na teplotu -80 °C, kde byly uchovávány až do jejich následného využití v dalších experimentech této odborné práce.

4.4 Reverzní transkripce

K reverzní transkripci jsem použil RNA vyizolovanou ze vzorků periferní krve, kostní dřeně a primárního tumoru (viz. 4.3 Izolace nukleové kyseliny). V prvním kroku jsem do každé z předem označených zkumavek napipetoval 10 μ l vyizolované RNA. Mezi manipulací s jednotlivými vzorky jsem měnil ochranné rukavice, abych minimalizoval riziko případné kontaminace materiálu. Kromě těchto reakčních zkumavek jsem připravil i jednu kontrolní

zkumavku, do které jsem místo RNA vzorku přidal 10 μ l sterilizované vody. Tato zkumavka sloužila jako negativní kontrola pro detekci případné kontaminace.

Následně jsem, v závislosti na celkovém počtu vzorků, připravil reakční Mastermix. Množství reagensií na jednu reakci činilo: 1,2 μ l sterilní vody, 4 μ l 5 $\times$ First Strand Bufferu, 2 μ l DTT, 1 μ l Primeru "random" p(dN)₆, 0,2 μ l dATP, 0,2 μ l dCTP, 0,2 μ l dGTP a 0,2 μ l dTTP. Všechny zkumavky se vzorky jsem poté umístil na 5 minut do termobloku předeřátého na 70 °C za účelem denaturace RNA a odstranění případných sekundárních struktur, které by mohly negativně ovlivnit průběh reverzní transkripce.

Během této doby jsem do připraveného Mastermixu přidal reverzní transkriptázu, a to v objemu 1 μ l na jednu reakci. Enzym jsem do té doby uchovával v mrazáku při teplotě -20 °C a během celého procesu jsem ho měl uložený v chladicím stojánku, aby byla zachována jeho enzymatická aktivita. Po uplynutí inkubační doby při 70 °C jsem do každé zkumavky s denaturovanou RNA přidal 10 μ l Mastermixu, přičemž jsem začal se zkumavkou s negativní kontrolou, abych minimalizoval riziko přenosu případných kontaminantů. Mezi jednotlivými vzorky jsem opět měnil rukavice.

Následně jsem všechny vzorky důkladně zvortexoval a krátce centrifugoval, aby došlo k rovnoměrné resuspendaci materiálu v celém objemu vzorku. Poté jsem vzorky inkuboval po dobu 1 hodiny v termobloku předeřátém na 37 °C, během níž došlo k syntéze komplementární DNA (cDNA) z templátu RNA. Po dokončení reverzní transkripce jsem cDNA uložil do mrazicího boxu nastaveného na teplotu -20 °C, kde byla skladována až do jejího využití v následujících fázích experimentálního postupu.

4.5 Měření koncentrace

Při měření koncentrace komplementární DNA (cDNA) jsem využíval přístroj Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer od společnosti Thermo Fisher Scientific. Pro kvantifikaci vzorků jsem použil dva různé kity, konkrétně Qubit™ dsDNA Quantification High Sensitivity (HS) Assay Kit a Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit, oba pocházející od společnosti Thermo Fisher Scientific. Důvodem byla změna standardního kitu používaného v Laboratoři molekulární patologie ve Fakultní nemocnici v Motole. Oba kity umožňovaly kvantifikaci vzorků s obsahem DNA v rozsahu 0,1 až 120 ng, přičemž výsledná koncentrace byla v rozmezí 0,005 až 120 ng/ μ L.

V případě použití kitu Qubit™ dsDNA Quantification High Sensitivity (HS) Assay Kit jsem nejprve připravil pracovní roztok smísením pufru a fluorescenční barvy. Do 15ml zkumavky jsem v přepočtu na jednu reakci napipetoval 199 μ l pufru Qubit™ dsDNA HS Buffer a 1 μ l barvy Qubit™ dsDNA HS Reagent * 200X. Celkový objem pracovní směsi jsem upravil podle počtu analyzovaných vzorků, dvou standardů a jednoho rezervního vzorku, aby bylo možné kompenzovat případné ztráty materiálu způsobené ulpíváním reagensů na povrchu pipetovacích špiček. Obsah zkumavky jsem následně zvortexoval za účelem dosažení homogenní směsi.

V případě použití kitu Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit jsem fázi přípravy pracovního roztoku vynechal, jelikož tento kit obsahuje již hotový roztok Qubit™ 1X dsDNA HS Working Solution, který má barvu předem přidanou. Na rozdíl od předchozího kitu byl tento pracovní roztok skladován při teplotě 4 °C a před použitím musel být temperován po dobu 30 minut na pokojovou teplotu. Během této úvodní fáze, tedy buď při přípravě směsi pufru s barvou, nebo při temperaci roztoku, jsem zároveň nechal temperovat i standardy, které byly rovněž uchovávány při teplotě 4 °C.

Po dokončení počáteční fáze přípravy jsem do předem označených zkumavek Qubit™ Assay Tubes, které jsou speciálně navrženy pro měření na přístroji Qubit, napipetoval pracovní roztok obsahující pufr s barvivem a příslušné vzorky. Do každé zkumavky určené k měření vzorků jsem napipetoval 199 μ l pufru s barvou a následně přidal 1 μ l příslušné cDNA. Do dvou zkumavek určených pro měření standardů jsem napipetoval 190 μ l pufru s barvou a 10 μ l příslušného standardu – v případě použití kitu Qubit™ dsDNA Quantification High Sensitivity (HS) Assay Kit jsem použil standardy Qubit™ dsDNA HS Standard #1 a Qubit™ dsDNA HS Standard #2, zatímco při použití kitu Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit jsem využil standardy Qubit™ 1X dsDNA HS Standard #1 a Qubit™ 1X dsDNA HS Standard #2.

Všechny připravené zkumavky jsem následně důkladně zvortexoval a krátce centrifugoval, aby došlo k homogennímu promíchání obsahu a odstranění případných bublinek, které by mohly negativně ovlivnit přesnost měření.

Závěrečnou fází byl samotný proces měření koncentrace. Na přístroji Qubit jsem zvolil příslušný program ds DNA high sensitivity. Nejprve jsem změřil koncentrace standardů, čímž jsem umožnil přístroji vytvořit kalibrační křivku. Následně jsem postupně provedl měření všech vzorků a zaznamenal jejich koncentrace v jednotkách ng/ μ l.

Kromě měření koncentrace cDNA, jsem také musel provést měření koncentrace 5 vzorků RNA v rámci jejich přípravy k provedení NGS. Při zpracování těchto vzorků jsem využíval Qubit™ RNA High Sensitivity (HS) Assay Kit od společnosti Thermo Fisher Scientific, přičemž postup byl podobný jako při zpracování cDNA za pomoci kitu Qubit™ dsDNA Quantification High Sensitivity (HS) Assay Kit, s tím rozdílem, že jsem na přístroji Qubit zvolil program ss RNA high sensitivity.

4.6 Kvantitativní PCR

V rámci qPCR jsem analyzoval počet kopií cDNA 112 vzorků, přičemž od každého z 16 pacientů bylo zpracováno vždy 7 vzorků. Tento počet byl zvolen záměrně, jelikož získaná data byla dále využita v rámci cíle 2, tedy pro porovnání s výsledky dPCR, kde jsou používány destičky s maximální kapacitou 8 vzorků. Do jedné destičky se tak vešly všechny vzorky od jednoho pacienta včetně negativní kontroly. Z uvedených 112 vzorků mRNA bylo 64 izolováno z periferní krve, 39 z kostní dřeně a zbývajících 9 z primárního tumoru.

U každého z těchto vzorků jsem provedl dvě samostatné qPCR reakce. Nejprve jsem za použití amplifikace cDNA, vytvořené z mRNA (viz. 4.4 Reverzní transkripce), měřil expresi genu pro beta-2-mikroglobulin (*B2M*), který je díky své relativně konstantní expresi v různých typech tkání běžně využíván jako referenční gen v nádorové diagnostice.

Po ověření kvality jednotlivých vzorků na základě měření exprese genu *B2M* jsem ze souboru vyřadil vzorky, u nichž kvalita materiálu nebyla dostatečná pro další analýzy. U zbývajících vzorků jsem následně za pomoci qPCR měřil expresi genu *ALK*. Tato exprese je v Laboratoři molekulární patologie ve Fakultní nemocnici v Motole rutinně využívána pro diagnostické a prognostické účely v rámci detekce MRN. Na rozdíl od přímého stanovení exprese fúzního genu *NPM1::ALK* lze tímto způsobem cílit i na další fúzní partnery genu *ALK* u pacientů s ALK+ ALCL, případně u jiných nádorových onemocnění, v nichž dochází k mutaci genu *ALK*.

Jako první krok qPCR reakce jsem připravil Mastermix. V případě měření exprese genu *B2M* se Mastermix, přepočtený na jednu reakci, skládal z 6,5 µl sterilní vody, 10 µl TaqMan™ Universal PCR Master Mixu od společnosti ThermoFisher Scientific, který dle specifikace výrobce obsahoval Amplitaq Gold™ DNA polymerázu, uracil-DNA glykosylázu, dNTP s dUTP, pasivní referenci 1 a optimalizované komponenty pufru (*TaqMan™ Universal PCR Master Mix*, n.d.), dále 1 µl primeru B2M-S, 1 µl primeru B2M-A a 0,5 µl B2M sondy.

V případě měření exprese genu *ALK* jsem připravil Mastermix v přepočtu na jednu reakci z 6,5 μ l sterilizované vody, 10 μ l FastStart TaqMan® Probe Masteru od společnosti Roche, který dle údajů výrobce obsahoval FastStart Taq DNA polymerázu, reakční pufr a nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) (*FastStart TaqMan® Probe Master*, n.d.), dále 1 μ l primeru ALK 37 L, 1 μ l primeru ALK 37 R a 0,5 μ l ALK sondy.

Připravený Mastermix jsem následně napipetoval do 96jamkové optické PCR destičky typu Hard-Shell® PCR Plates 96-Well Low-Profile, Semi-Skirted od společnosti Bio-Rad, přičemž do každé z vybraných jamek jsem přidal 19 μ l Mastermixu. Pro minimalizaci rizika kontaminace jsem do prvního řádku destičky (označeného písmenem A) umístil ředící řadu. Do středních řad (označených písmeny D a E) jsem napipetoval vzorky určené k analýze a do posledních dvou pozic destičky (označených H11 a H12) jsem přidal negativní kontrolu. Do všech použitých jamek jsem následně přidal 1 μ l příslušného vzorku, přičemž jsem při pipetování vždy použil novou špičku a promísil obsah jamky, aby došlo k rovnoměrnému rozmístění reakční směsi.

V případě měření exprese genu *B2M* jsem pro ředící řadu použil komerčně dostupný standard B2M Control Gene Standards od společnosti ipsogen v koncentracích odpovídajících 2×10 , 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 a 2×10^6 kopií. Jednalo se tedy o šest ředění, přičemž každé bylo na PCR destičce zastoupeno v duplikátu.

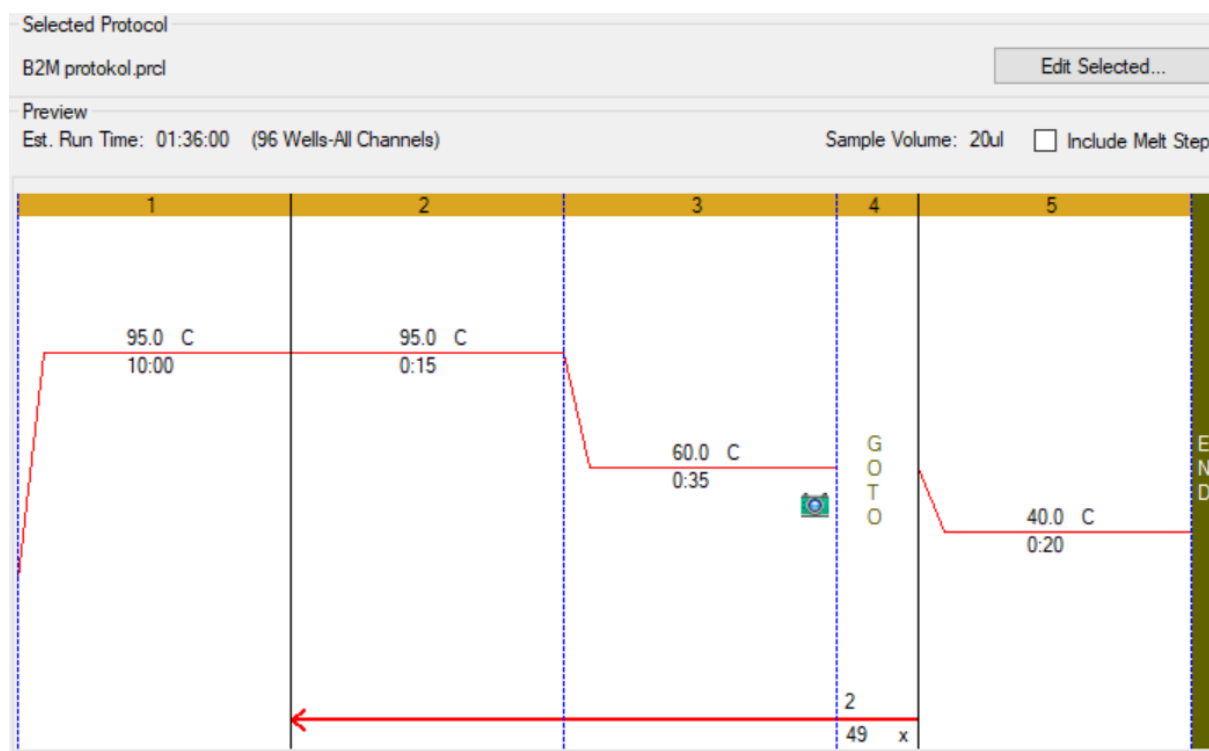
Při měření exprese genu *ALK* jsem jako standard použil rekombinantní plazmid nesoucí klonovanou sekvenci genu *ALK*, amplifikovaný v expresním systému *Escherichia coli*, který je rutinně využíván v Laboratoři molekulární patologie ve Fakultní nemocnici v Motole (podrobněji popsán ve studii Kalinova et al., 2008 (Kalinova et al., 2008)). Tento standard jsem použil v ředěních 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} a 10^{-8} . Celkem se tedy jednalo o čtyři koncentrace; první tři jsem pipetoval v duplikátu, zatímco poslední, vzhledem k vyššímu ředění a tím pádem i vyššímu riziku technické chyby, jsem pipetoval v triplicátu.

Při aplikaci vzorků cDNA na destičku jsem každou cDNA analyzoval ve duplikátech. Za standardních diagnostických podmínek jsou vzorky zpravidla vyhodnocovány v triplicátu, nicméně v tomto případě bylo z ekonomických důvodů rozhodnuto o použití duplikátů. Jako negativní kontrolu jsem použil sterilní vodu, přičemž negativní kontrola zde byla také sledována v duplikátu.

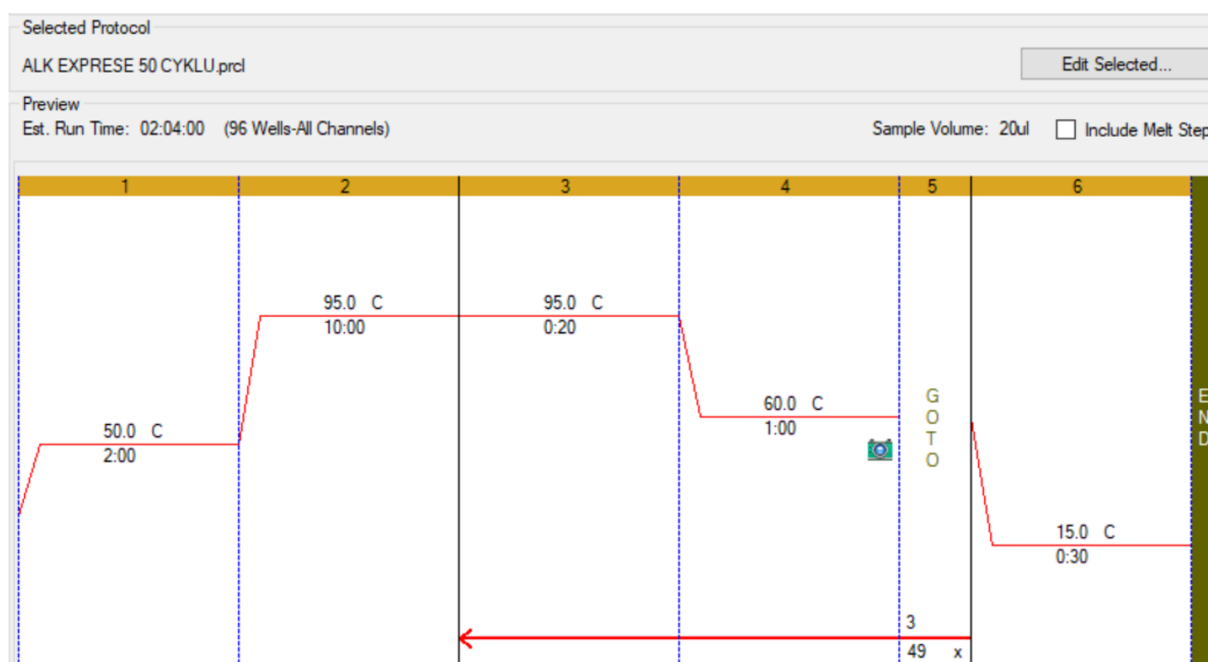
Po ukončení pipetování jsem PCR destičku zakryl optickou lepící fólií a důkladně ji utěsnil po celém obvodu i povrchu, aby byla zajištěna úplná izolace vzorků během qPCR

analýzy. Následně jsem destičku centrifugoval při 1700 otáčkách za minutu, aby došlo k eliminaci případných vzduchových bublin, které by mohly negativně ovlivnit přesnost fluorescence a tím i výsledky měření.

Následně jsem vložil PCR destičku do přístroje CFX Opus 96 Real-Time PCR System #12011319 od společnosti Bio-Rad. V přidruženém softwaru k tomuto systému jsem jako metodu fluorescenční detekce zvolil systém využívající k detekci sondu. Dále jsem upravil konfiguraci destičky tak, aby odpovídala skutečnému rozložení nanesených vzorků, čímž jsem zajistil přehlednou orientaci a usnadnil následnou analýzu výsledků. Pro kvantifikaci exprese jsem zvolil odpovídající protokol optimalizovaný pro daný cílový gen. Podoba použitých protokolů je znázorněna na přiložených schématech (Obrázek 7 a 8).



Obrázek 7 Protokol pro sledování exprese genu B2M za pomoci qPCR



Obrázek 8 Protokol pro sledování exprese genu *ALK* za pomoci qPCR

Výsledná data jsem na závěr vyhodnotil za pomoci programu CFX Maestro Software 2.3 for Windows PC #12013758.

4.7 Digitální PCR

V rámci testování pomocí dPCR jsem analyzoval všech 142 vzorků cDNA získaných od pacientů s ALK+ ALCL, přičemž cílem této analýzy bylo stanovení exprese fúzního genu *NPM1::ALK*. Tato exprese byla kvantifikována v rámci multiplexní detekce společně s referenčním genem pro Abelsonovu tyrosinkinázu 1 (*ABL1*), který díky své konstitutivní expresi sloužil jako vnitřní pozitivní kontrola kvality reakce.

V případě 62 z těchto jsem z důvodu vysoké koncentrace musel provést ředění tak, aby ve výsledném vzorku bylo 50 ng testované cDNA. Toho jsem docílil za pomoci následujících rovnic:

$$x = \frac{50}{y}$$

$$z = 2,5 - x$$

x= množství použitého vzorku cDNA (μl)

y= naměřená koncentrace použitého vzorku (ng/μl)

z= množství použité sterilní vody (μl)

V případech, kdy koncentrace cDNA byla nízká, tedy $\leq 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$, jsem přímo použil 2,5 μl vzorku bez dalšího ředění a do připravené tabulky jsem zaznamenal odpovídající množství cDNA v ng, které se rovnalo hodnotě koncentrace vynásobené koeficientem 2,5.

Při přípravě reagensií jsem nejprve připravil Mastermix, který se v přepočtu na jednu reakci skládal z 14,5 μl sterilní vody, 8 μl Digital LightCycler® 5x DNA Masteru od společnosti Roche (dle údajů výrobce obsahuje termostabilní DNA polymerázu, enzym AmpErase pro odstranění kontaminačních amplikonů z předchozích PCR reakcí, přičemž dTTP je nahrazeno dUTP (*Digital LightCycler® 5x DNA Master*, n.d.)), 2,5 μl sondy Probe ABL (4 $\text{ng}/\mu\text{l}$), 1,25 μl primeru ABL F (10 μM), 1,25 μl primeru ABL R (10 μM), 2,5 μl sondy Probe ALK::NPM (4 $\text{ng}/\mu\text{l}$), 1,25 μl primeru ALK::NPM F (10 μM) a 1,25 μl primeru ALK::NPM R (10 μM).

Takto připravený Mastermix jsem následně vortexoval, krátce centrifugoval a rozpipetoval do předem připravených a označených 0,5ml zkumavek, přičemž do každé zkumavky jsem přidal 32,5 μl směsi. Poté jsem do zkumavek určených pro vzorky přidal 2,5 μl cDNA, jejíž příprava byla popsána dříve. Současně jsem připravil odpovídající počet zkumavek s negativní kontrolou, v nichž jsem vzorky cDNA nahradil sterilní vodou. Všechny zkumavky jsem poté vortexoval a krátce centrifugoval za účelem dosažení homogenizace vzorku v celém objemu zkumavky.

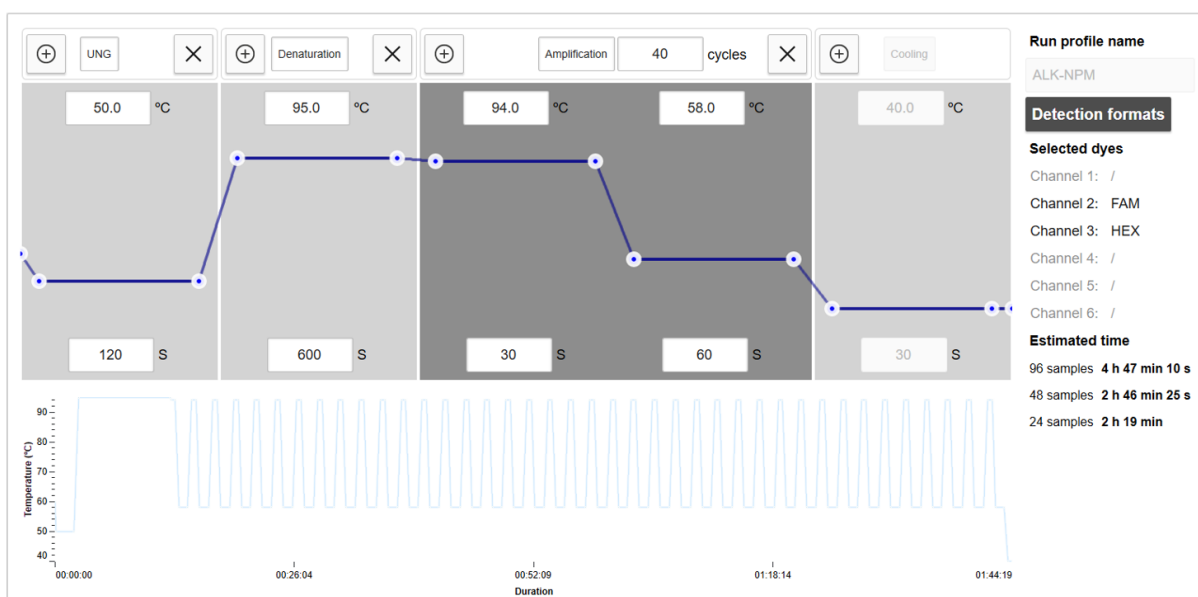
Takto připravené zkumavky jsem následně přenesl do místnosti určené pro dPCR. Nejprve jsem zapnul veškeré přístroje potřebné pro následující kroky, jelikož od napipetování vzorků do destiček do jejich vložení do přístroje Digital LightCycler Partitioning Engine nesmělo uplynout více než 15 minut. Připravil jsem si odpovídající počet destiček s tím, že jedna plně zaplněná destička odpovídala kapacitě sedmi vzorků a jedné negativní kontroly. V rámci tohoto experimentu jsem použil destičky typu Digital LightCycler® Universal Nanowell Plate od společnosti Roche. Tyto destičky jsou určeny ke kvantifikaci genové exprese a každý jejich řádek obsahuje 28 000 nanojamek.

Při přípravě destiček jsem do každé jamky napipetoval 30 μl příslušného vzorku nebo, v případě poslední jamky, 30 μl negativní kontroly. Pipetovací špičku jsem přitom umístil na dno jamky ve směru následujícího řádku, což zajistilo rovnoměrné rozprostření vzorku přibližně do poloviny řádku. Následně jsem destičku vložil do přístroje Digital LightCycler

Partitioning Engine, jehož funkcí je rovnoměrné rozmístění vzorku do nanojamek po celé délce řádku. V mezičase tohoto procesu jsem vždy napipetoval následující destičku.

Po ukončení pipetování a rovnoměrném rozmístění všech vzorků do příslušných destiček jsem vložil všechny destičky do přístroje Digital LightCycler. Oba použité přístroje byly zakoupeny od společnosti Roche a dohromady tvořily systém označovaný jako Digital LightCycler® dPCR System. Jako poslední krok jsem zvolil příslušný protokol a spustil amplifikační cyklus. Podoba použitého protokolu je zobrazena na následujícím obrázku (Obrázek 9).

V rámci tohoto protokolu byly sledovány dva fluorescenční kanály. Primární analyzovaný cíl, tedy exprese fúzního genu *NPM1::ALK*, byl detekován pomocí sondy obsahující fluorofor 6-karboxyfluorescein (FAM). Pro sledování exprese referenčního genu *ABL1* byla využita sonda obsahující fluorofor hexachlorofluorescein (HEX).



Obrázek 9 Protokol pro sledování exprese genu *ALK* za pomoci dPCR

Po skončení reakce jsem výsledná data vyhodnotil za pomoci programu Digital LightCycler® Development Software.

4.8 Sangerovo sekvenování

Za pomoci Sangerova sekvenování jsem analyzoval dva vzorky pacientů s diagnózou ALK+ ALCL, u nichž byla identifikována přítomnost fúzního genu *TPM3::ALK*. Cílem tohoto sekvenování bylo získat sekvenci fúzního transkriptu, která by následně mohla sloužit

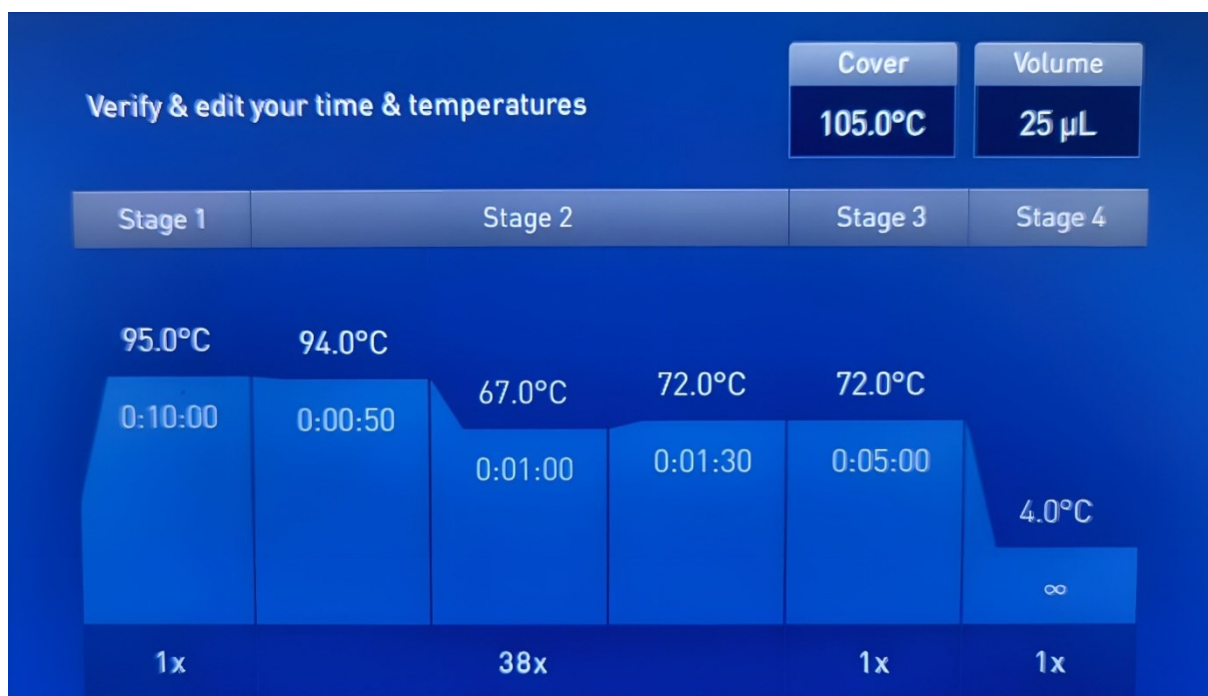
jako templát pro návrh specifické sondy určené ke sledování MRN u pacientů s touto chromosomální translokací t(1;2)(q25;p23).

Prvním krokem byla polymerázová řetězová reakce (PCR), jejímž cílem byla amplifikace cDNA sekvence určené k následnému sekvenování. Nejprve jsem připravil reakční Mastermix, který v přepočtu na jednu reakci obsahoval 15,8 µl sterilní vody, 2,5 µl pufru 10X PCR Buffer II, 2,5 µl směsi dNTP o koncentraci 2 mM, 1,5 µl roztoku chloridu hořečnatého (MgCl₂) o koncentraci 25 mM, 0,25 µl primeru Primer ALK3455R a 0,25 µl primeru Primer TPM3/249F. V Laboratoři molekulární patologie ve Fakultní nemocnici Motol se pro detekci této mutace standardně využívá dvoukolová PCR. Výše uvedené primery jsou určeny pro první kolo amplifikace, přičemž jejich volba mi umožnila získat delší sekvenční úsek cDNA, do kterého bylo možné navrhnout detekční sondu. Následně jsem přidal 0,2 µl polymerázy AmpliTaq Gold (250 U) od společnosti Thermo Fisher Scientific, která byla až do okamžiku použití uchovávána při teplotě -20 °C, aby byla zachována její enzymatická aktivita.

Připravený Mastermix jsem následně rozpíetoval po 23 µl do předem označených 0,2ml PCR zkumavek. Do čtyř z těchto zkumavek jsem přidal po 2 µl obou testovaných vzorků, každý ve dvou technických replikách. Do jedné zkumavky jsem přidal 2 µl pozitivní kontroly, kterou tvořil patientský vzorek (označený jako 19/134/8), jenž byl předchozí analýzou identifikován jako pozitivní. Do zbývajících dvou zkumavek jsem přidal 2 µl negativních kontrol. První z nich představovala negativní kontrolu z reverzní transkripce příslušných vzorků a druhá byla negativní kontrolou PCR reakce, kde byla místo vzorku použita sterilní voda.

Všechny zkumavky jsem následně zvortexoval a krátce centrifugoval, aby došlo k homogenizaci obsahu, a poté jsem je přenesl z místnosti určené pro přípravu PCR (pre-PCR) do místnosti určené pro práci s amplifikovanými produkty (post-PCR). Zde jsem je vložil do přístroje ProFlex PCR System od společnosti Thermo Fisher Scientific a spustil příslušný

protokol, jehož parametry jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obrázek 10).



Obrázek 10 Protokol pro amplifikaci cDNA, vzniklé z mRNA pro TPM3::ALK, určenou k Sangerově sekvenaci.

Po ukončení PCR reakce jsem ověřil úspěšnost amplifikace cDNA pomocí agarózové gelové elektroforézy. Nejprve jsem připravil 1,5 % agarózový gel. Do 100 ml 1× TBE (Tris-borát-EDTA) pufru jsem přidal tři tablety SERVA Agarose tablets (každá o hmotnosti 0,5g) od společnosti SERVA a nechal je krátce rozpouštět. Následně jsem nádobu obsahující pufr s tabletami vložil na 2,5 minuty do mikrovlnné trouby. Během ohřívání jsem několikrát přerušil proces a směs promíchal, aby došlo k rovnoměrnému rozpuštění agarózy.

Po úplném rozpuštění jsem roztok nalil do gelové formy s vloženým hřebínkem. Po ztuhnutí gelu jsem nejprve opatrně odstranil hřebínek a poté jsem gel upevnil do elektroforetické vany naplněné 1× TBE pufrem tak, aby byl celý ponořený pod hladinou pufru. Do první jamky jsem aplikoval 1,3 µl markeru 100 bp DNA Ladder a do zbývajících jamek jsem nanesl 6 µl jednotlivých vzorků nebo kontrol, které byly předem smíchány s 2 µl indikačního barviva 10× BlueJuice™ Gel Loading Buffer od společnosti Thermo Fisher Scientific.

Následně jsem spustil elektroforézu a nechal vzorky separovat po dobu 25 minut. Průběžně jsem kontroloval gel, abych zajistil, že nedošlo k jeho oddělení od elektroforetické vany. Po ukončení migrace nukleových kyselin jsem gel vyňal z vany a vložil jej do přístroje

MiniBIS Pro od společnosti DNR Bio-Imaging Systems, který slouží k vizualizaci DNA, RNA a proteinů separovaných na gelech elektroforézou. Na přístroji jsem aktivoval UV vizualizační režim a k detekci jsem využil software GelCaptureMiniBis.

Po amplifikaci cDNA pomocí PCR a následném ověření její kvality elektroforézou jsem přistoupil k přečištění PCR produktů, které bylo nezbytné před provedením sekvenační reakce. K tomuto účelu jsem využil soupravu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit od společnosti Geneaid.

Nejprve jsem si ke každému vzorku připravil purifikační kolonu s filtrační membránou zasazenou do odpadní zkumavky. K 20 µl PCR produktu jsem následně přidal 100 µl pufru DF Buffer a reagentie promíchal pomocí špičky pipety. Celý objem směsi jsem přenesl do purifikační kolony. Tu jsem spolu s odpadní zkumavkou vložil do centrifugy Centrifuge 5430 R od společnosti Eppendorf, která byla používána při všech centrifugačních krocích během přípravy vzorků pro Sangerovo sekvenování. Vzorky jsem centrifugoval po dobu 1 minuty při 14 000 RPM.

Po ukončení centrifugace jsem kolony vyjmul a přidal k nim 600 µl pufru WASH Buffer. Kolony jsem nechal stát 1 minutu při laboratorní teplotě. Díky nízkému objemu aplikovaných reagentií nebylo po první centrifugaci nutné měnit odpadní kolonu. Následně jsem provedl další centrifugaci za stejných podmínek, tedy při 14 000 RPM po dobu 1 minuty.

Po odstranění pufru jsem odpadní kolonu vyprázdnil vylitím jejího obsahu a provedl ještě jednu dodatečnou centrifugaci po dobu 3 minut při stejné rychlosti, abych odstranil zbytkovou vlhkost. Poté jsem purifikační kolony s filtrační membránou přenesl do připravených a označených 1,5ml mikrozkuvek, zatímco odpadní kolony jsem vyřadil.

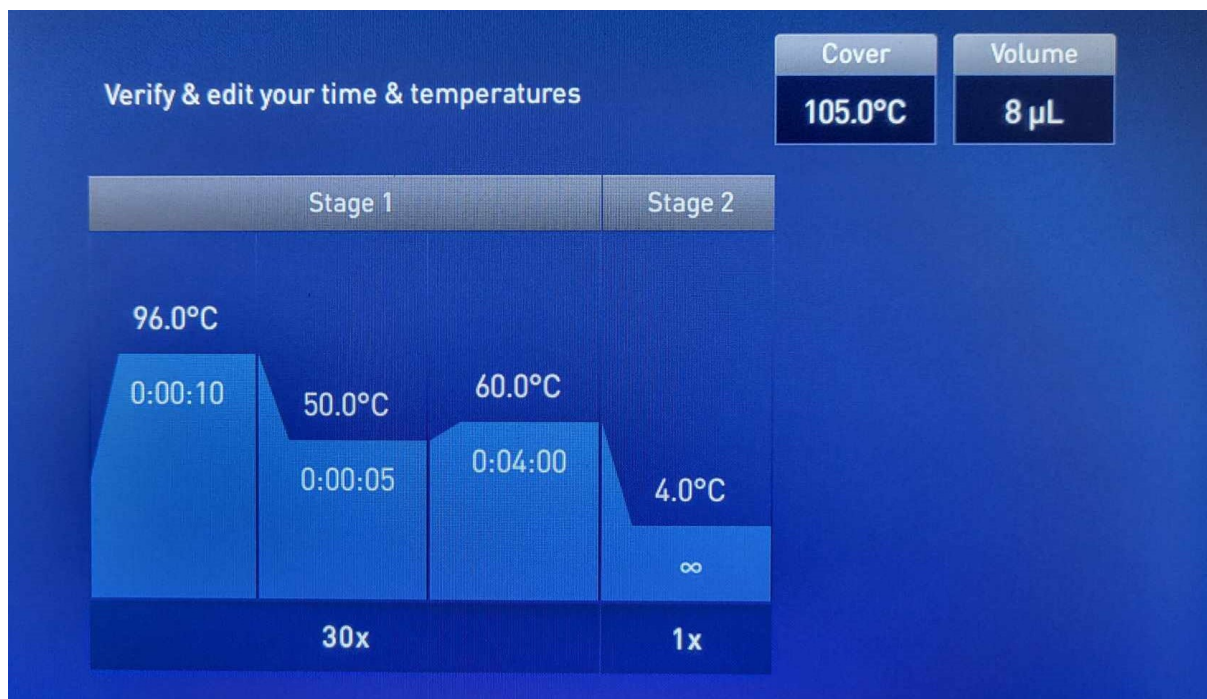
Do každé kolony s filtrem jsem následně přidal 50 µl pufru Elution Buffer, přičemž jsem dbal na to, aby byl pufr nanesen přímo na filtrační membránu, ale zároveň jsem postupoval dostatečně opatrně, abych se nedotkl filtru a nenarušil jeho integritu. Kolony s aplikovaným pufrem jsem ponechal 2 minuty při pokojové teplotě a následně jsem je centrifugoval po dobu 2 minut při 14 000 RPM.

Po dokončení eluce jsem filtrační kolony vyhodil a získané eluáty v mikrozkuvkách jsem dále využil pro sekvenační reakce.

Při přípravě vzorků pro sekvenační reakci jsem využil reagentie obsažené v soupravě BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit od společnosti Thermo Fisher. Nejprve jsem si připravil reakční Mastermix, který se pro jednu reakci skládal z 5,5 µl sterilní vody a 0,5 µl BigDye® Terminator směsi. Tato směs, kromě základních komponent běžné PCR reakce, jako jsou dNTP, DNA polymeráza a pufr, obsahovala také fluorescenčně značené dideoxynukleotidy (ddNTPs), které náhodně ukončovaly syntézu DNA, což je klíčové pro následné určení sekvence (*BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, n.d.).

Připravený Mastermix jsem po zvortexování a krátké centrifugaci rozdělil po 6 µl do předem popsanych 0,2ml PCR zkumavek. Do prvních dvou zkumavek jsem přidal po 1 µl cDNA z prvního přečištěného duplikátu patientského vzorku a do zbývajících dvou zkumavek jsem přidal stejné množství cDNA z druhého přečištěného duplikátu téhož vzorku. Následně jsem do první a třetí zkumavky přidal 1 µl primeru Primer ALK3455R a do druhé a čtvrté zkumavky 1 µl primeru Primer TPM3/249F.

Tímto způsobem jsem připravil čtyři vzorky, z nichž každý obsahoval unikátní kombinaci patientského duplikátu a specifického primeru. Takto připravené reakce jsem zvortexoval a krátce centrifugoval, abych zajistil důkladnou homogenizaci obsahu, a následně jsem je přenesl z prePCR místnosti do postPCR prostoru. Zkumavky jsem vložil do stejného PCR cykléru, který jsem použil při amplifikaci cDNA v předchozím kroku, a spustil odpovídající protokol, jehož podoba je znázorněna na následujícím obrázku (Obrázek 11).



Obrázek 11 Protokol využívaný při sekvenační reakci

Po dokončení sekvenační reakce jsem musel výsledné produkty opět přechistit, k čemuž jsem využil reagentie z kitu DNA, RNA and Protein Purification od společnosti Macherey-Nagel. Nejprve jsem si pro každý vzorek připravil kolonu s gelem. Tyto kolony jsem následně centrifugoval po dobu 30 sekund při rychlosti 3000 RPM. Po centrifugaci jsem do každé kolony přidal 600 µl sterilní vody a nechal je inkubovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

Poté jsem z horní části každé kolony odstranil spodní zátku a kolony centrifugoval po dobu 2 minut při 3000 RPM. Po dokončení centrifugace jsem horní části kolon s gelem přenesl do připravených 1,5ml zkumavek s odštíženými víčky, zatímco spodní části kolon jsem zlikvidoval. Následně jsem ke každému z dříve přechištěných sekvenačních produktů přidal 15 µl sterilní vody, promíchal je pomocí pipetovací špičky a celý objem přenesl na střed gelu v příslušné koloně, přičemž jsem dbal na to, abych nepoškodil gelovou matici.

Takto připravené kolony jsem centrifugoval po dobu 4 minut při rychlosti 3000 RPM. Během této doby jsem vyjmul ze sekvenátoru 3500 Genetic Analyzer od společnosti Thermo Fisher Scientific sekvenační destičku a přenesl ji do postPCR místnosti. Po ukončení centrifugace jsem jednotlivé eluované vzorky přepipetoval do příslušných jamek sekvenační destičky.

Do všech zbývajících prázdných jamek v příslušném řádku destičky jsem napipetoval 25 µl Hi-Di™ formamidu od společnosti Thermo Fisher Scientific, aby se zabránilo vzniku vzduchových bublin, které by mohly poškodit kapiláry sekvenátoru. Destičku jsem následně zakryl gumovým septem, čímž jsem zajistil izolaci jednotlivých vzorků, a vložil ji do připraveného plastového stojanu. Takto připravenou destičku jsem přenesl zpět do sekvenátoru a spustil sekvenační proces.

4.9 Navrhování sondy

Po získání sekvence nukleotidů v cDNA fúzního genu *TPM3::ALK*, kterou jsem získal za použití Sangerova sekvenování (viz. 4.8 Sangerovo sekvenování), jsem tuto sekvenci využil k návrhu sondy pro monitorování onemocnění u pacientů s ALK+ ALCL s fúzním genem *TPM3::ALK*. Získanou sekvenci jsem zobrazil v programu Chromas 1.5. Následně jsem za pomoci genomové databáze Ensembl vyhledal sekvence cDNA vzniklé z mRNA kódující proteiny TPM3 a ALK. Tyto nalezené sekvence jsem porovnal s výslednou sekvencí, kterou jsem získal při sekvenační reakci patientského vzorku za pomoci primeru Primer ALK3455R, za použití nástroje Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

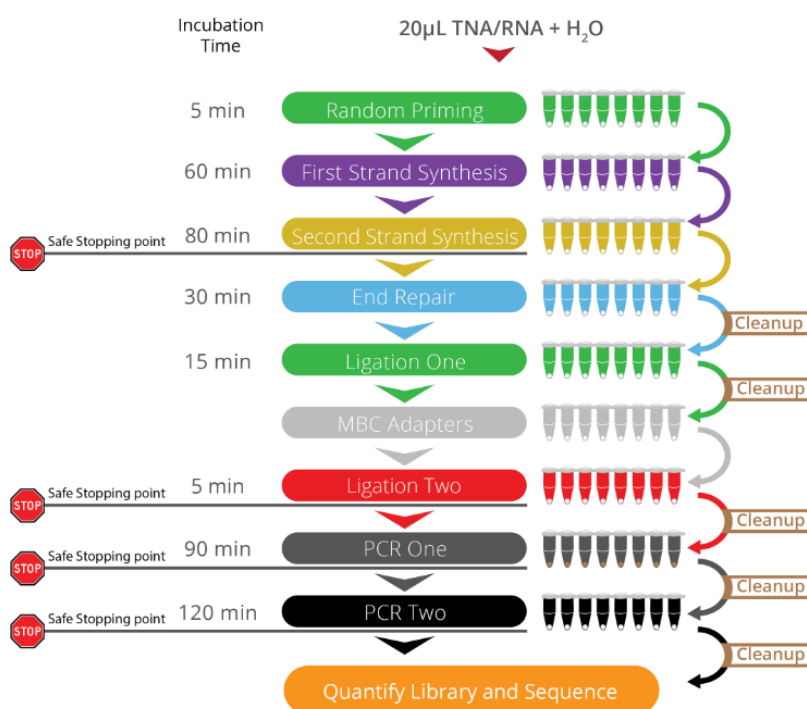
Porovnáním sekvencí *TPM3* a *ALK* s výslednou sekvencí z patientského vzorku jsem byl schopen identifikovat místo v genech obou těchto proteinů, kde došlo k translokaci. Následně jsem provedl převod sekvence získané pomocí primeru Primer ALK3455R na její reverzní komplementární verzi, čímž jsem zajistil, že obě sekvence byly na stejném vlákně a ve stejném směru. Poté jsem tyto sekvence spojil tak, aby část fúzního genu *ALK* byla získána pomocí primeru Primer TPM3/249F a část *TPM3* pomocí primeru Primer ALK3455R. Tento postup jsem zvolil, protože při použití Sangerova sekvenování dochází k neúplnému nebo nepřesnému načtení nukleotidové sekvence v 5' oblasti analyzovaného vzorku. Proto bylo vhodnější použít sekvenci, která měla sledovanou část fúzního genu umístěnou v 3' oblasti. Tento spojený sekvenční produkt jsem následně využil při návrhu primerů a sondy pro sledovanou fúzi *TPM3::ALK*.

4.10 Sekvenování nové generace

Za pomoci sekvenování nové generace (NGS) jsem sekvenoval 5 vzorků RNA. Z těchto 5 vzorků 3 pocházeli od pacientů s fúzním genem *NPM1::ALK*, přičemž se v tomto případě jednalo o pacienty označené jako Pacienti č. 3, 10 a 12. Zbýlé 2 vzorky pocházeli po jednom od pacientů s fúzním genem *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*.

Při zpracování vzorků jsem využíval protokol Archer® FusionPlex® Protocol for Illumina® (*Archer® FusionPlex® Protocol for Illumina®*, n.d.). V rámci tohoto protokolu jsem využíval 2 rozdílné NGS panely od společnosti IDT, přičemž při porovnávání patientských vzorků RNA s fúzní mutací *NPM1::ALK* jsem využíval Archer™ FUSIONPlex™ Lymphoma panel (*Archer FUSIONPlex Lymphoma Panel | IDT*, n.d.) a při porovnávání pacientů s rozdílnými fúzemi, tedy *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*, jsem využil NGS panel Archer™ FUSIONPlex™ Lung v2 panel (*Archer FUSIONPlex Lung Panel v2 | IDT*, n.d.).

Před samotným zpracováním vzorků v rámci použitého protokolu jsem si nejdříve za pomoci Qubit, při využití kitu Broad Range RNA Assay, změřil jejich koncentraci (viz. 4.5 Měření koncentrace) a následně je naředil tak, aby vstupní množství odpovídalo 200 ng. Dále už jsem pokračoval podle použitého protokolu, přičemž jeho schéma a také protokoly použité v termocykleru jsou uvedeny na následujících obrázcích (Obrázek 12 a 13)



Obrázek 12 Postup při provádění NGS za pomoci protokolu Archer® FusionPlex® Protocol for Illumina®

Random Priming 2.0	Step	Temperature (°C)	Time (min)
	1	65	5
	2	4	Hold

First Strand cDNA Synthesis	Step	Temperature (°C)	Time (min)
	1	25	10
	2	42	30
	3	80	20
	4	4	Hold

Second Strand cDNA Synthesis	Step	Temperature (°C)	Time (min)
	1	16	60
	2	75	20
	3	4	Hold

PreSeq RNA QC Assay	Step	Temperature (°C)	Time (Sec)	Cycles
	Activation	95	20 [20*]	1
	Denaturation	95	3 [15*]	35
	Primer Annealing & Extension	60	30 [60*]	
	Melt-curve gradient	60-95	0.5°C/sec increment	1

*Times in [] are for standard cycling

End Repair	Step	Temperature (°C)	Time (min)
	1	25	30
	2	4	Hold

Ligation Step 1	Step	Temperature (°C)	Time (min)
	1	37	15
	2	4	Hold

Ligation Step 2	Step	Temperature (°C)	Time (min)
	1	22	5
	2	4	Hold

First PCR Reaction	Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
	1	95	3 min	1
	2	95	30 sec	15*
	3	65*	5* min (100% ramp rate)	
	4	72	3 min	1
	5	4	Hold	1

*Refer to product insert for panel-specific parameters.

Second PCR Reaction	Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
	1	95	3 min	1
	2	95	30 sec	20**
	3	65*	5* min (100% ramp rate)	
	4	72	3 min	1
	5	4	Hold	1

Obrázek 13 Protokoly pro termocyklery použité při zpracování protokolu Archer® FusionPlex® Protocol for Illumina®

Prvním krokem byla reverní transkripce, kdy jsem ke vzorkům přidal takové množství ultračisté vody, aby objem odpovídal 20 μ l, a tuto směs přenesl do Random Priming 2.0 reakčních zkumavek umístěných na ledu. Zkumavky jsem následně zvortexoval a zcentrifugoval, což jsem prováděl po každém přepipetování vzorků do nových typů reakčních zkumavek. Tyto zkumavky jsem následně umístil do termocykleru a spustil protokol pro Random Priming 2.0 (Obrázek 13).

Následně jsem tyto zkumavky krátce centrifugoval a přenesl z nich 20 μ l do reakčních zkumavek určených pro syntézu prvního vlákna cDNA umístěných na ledu. Zkumavky jsem následně umístil do termocykleru a spustil protokol pro syntézu prvního vlákna cDNA (Obrázek 13).

Do těchto zkumavek jsem následně přidal 20 μ l ultračisté vody, a celý objem 40 μ l jsem přenesl do zkumavek pro syntézu druhého vlákna cDNA umístěných na ledu. Zkumavky jsem následně umístil do termocykleru a spustil protokol pro syntézu druhého vlákna cDNA (Obrázek 13).

Následovala fáze opravy konců cDNA řetězců, kdy jsem nejdříve ze zkumavek přepipetoval všech 40 μ l do reakčních zkumavek určených pro opravu konců umístěných na ledu. Tyto zkumavky jsem následně umístil do termocykleru a spustil protokol pro opravu konců cDNA (Obrázek 13).

Po skončení protokolu následovala přečišťovací fáze, v rámci které jsem ke každému vzorku přidal 2,5-násobný objem zvortexovaných AMPure kuliček. Tyto zkumavky jsem zvortexoval, nechal stát 5 minut při laboratorní teplotě a následně je vložil do magnetického stojánku. Zde jsem je nechal stát po dobu 4 minut, dokud nebyly magnetické kuličky přichyceny na stěnu. Poté jsem za pomoci pipety odstranil supernatant a přidal 200 μ l 70 % etanolu, nechal je 30 sekund inkubovat a opět odstranil supernatant. Tento krok se 70 % etanolem jsem ještě jednou zopakoval a po posledním odstranění supernatantu jsem nechal zkumavky s otevřenými víčky vysychat 5 minut při laboratorní teplotě. Následně jsem eluoval cDNA za pomoci resuspendování magnetických kuliček v 20 μ l 10mM Tris-HCl.

Další fází byla ligace, kdy 20 μ l přečištěné cDNA přepipetoval do reakčních zkumavek určených pro ligační krok 1, a následně je umístil do termocykleru a spustil protokol pro ligační krok 1 (Obrázek 13). Po skončení reakce jsem vzorek opět přečistil, s tím že v poslední fázi bylo místo 20 μ l 10mM Tris-HCl použito 42 μ l. Následně jsem 40 μ l cDNA přepipetoval do předem nadepsaných MBC Adapter reakčních zkumavek, které byly umístěné

na ledu. Následně jsem přepipetoval veškerý obsah MBC Adapter reakčních zkumavek do reakčních zkumavek určených pro ligační krok 2, a poté je umístil do termocykléu a spustil protokol pro ligační krok 2 (Obrázek 13). Vzorky jsem následně přečistil za pomoci magnetických kuliček určených k přečištění ligační směsi.

Následovala fáze první PCR reakce, v rámci které jsem do zkumavek pro první PCR umístěných na ledu přidal 2 μ l GSP1 (Gene-Specific Primer 1), které se lišily v závislosti na tom, zda jsem v dané chvíli zpracovával vzorky za pomoci Lymfomového anebo plicního panelu. Poté jsem do zkumavek přidal 18 μ l přečištěné cDNA a zkumavky přemístil do termocykleru, a spustil protokol pro první PCR reakci. Po skončení reakce jsem vzorky s naamplifikovanou cDNA opět přečistil.

Další fází byla druhá PCR reakce, u které jsem do předem označených zkumavek pro druhé PCR umístěných na ledu přidal 2 μ l GSP2 (Gene-Specific Primer 2), které se opět lišily v závislosti na použitém panelu. Následně jsem do zkumavek přidal 18 μ l přečištěné cDNA a zkumavky přemístil do termocykleru, a spustil protokol pro druhou PCR reakci. Po skončení reakce jsem vzorky s naamplifikovanou cDNA opět přečistil.

Poslední fází byla sekvenace, ke které jsem získané vzorky naředil tak, aby výsledná koncentrace odpovídala 12 pM. K sekvenaci jsem využil sekvenátor MiSeq od společnosti Illumina, přičemž jako sekvenační chemii jsem použil MiSeq Reagent Kit v3 (*MiSeq Reagent Kit v3 | Highest Output of MiSeq Kits*, n.d.).

5 Výsledky

5.1 Srovnání použití dPCR a qPCR při sledování MRN

V rámci této části diplomové práce jsem analyzoval expresi fúzního genu *NPM1::ALK* u 112 vzorků cDNA. Tyto vzorky cDNA jsem připravil izolací a následnou reverzní transkripcí mRNA, která pocházela z 64 vzorků periferní krve, 39 vzorků kostní dřeně a 9 vzorků primárního tumoru. Vzorky byly získány od 16 pacientů, jejichž detailní charakteristika je uvedena v metodické části této práce (viz kapitola 4.2 Použité vzorky). Od každého pacienta jsem analyzoval vždy sedm vzorků. Toto množství jsem zvolil s ohledem na co nejefektivnější využití dostupného biologického materiálu, jelikož kvantifikační destička používaná při dPCR umožňuje současné testování osmi vzorků, tedy sedmi experimentálních a jedné negativní kontroly.

Před samotnou detekcí exprese fúzního transkriptu jsem u všech sledovaných vzorků provedl qPCR za účelem detekce exprese genu *B2M* (viz kapitola 4.6 Kvantitativní PCR). Gen *B2M* je v Laboratoři molekulární patologie Fakultní nemocnice v Motole standardně využíván jako referenční gen sloužící jako pozitivní kontrola amplifikace vzorku a zároveň pro normalizaci vzorků. Nejprve jsem expresi *B2M* použil jako pozitivní kontrolu kvality cDNA, přičemž jsem sledoval počáteční počet kopií (SQ) cDNA kódujících protein *B2M* v objemu 1 µl vzorku. Vzorky, u nichž se hodnota SQ pohybovala v rozmezí 10^4 až 10^7 kopií, jsem považoval za dostatečně kvalitní pro další analýzu. Naopak vzorky s nižšími hodnotami jsem z důvodu nízké kvality vyloučil z dalšího zpracování. Tímto způsobem jsem vyřadil celkem 4 vzorky, z nichž dva pocházely z periferní krve, jeden z kostní dřeně a jeden z primárního tumoru. V průběhu analýzy qPCR jsem hodnoty exprese *B2M* využil pro normalizaci exprese genu *ALK*.

Vzorec pro výpočet počátečního počtu kopií cDNA:

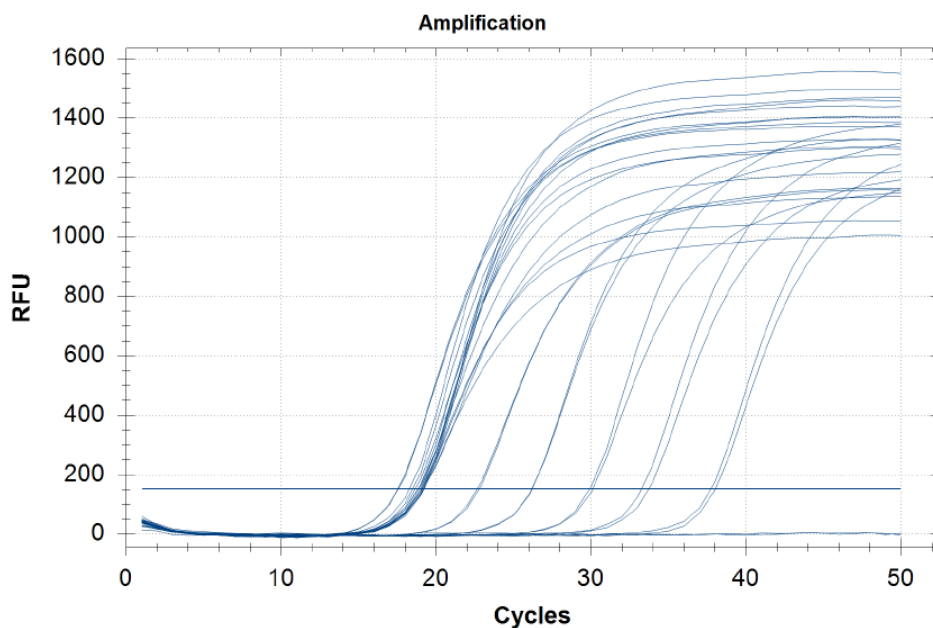
$$SQ = 10^{\frac{(Cq-b)}{m}}$$

SQ – Počáteční počet kopií cDNA v 1 µl

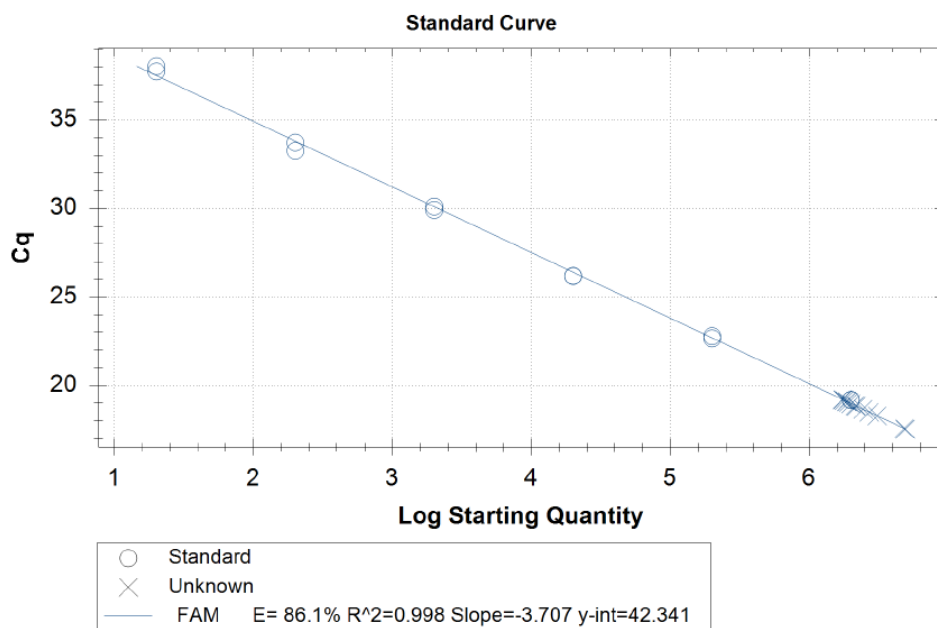
Cq – Kvantifikační cyklus, při kterém amplifikovaný produkt dosáhne detekovatelné úrovně fluorescence.

m – Sklon standardní křivky

b – Intercept, průsečík s osou Y



Graf 1 Příklad podoby amplifikačních křivek získaných za pomoci qPCR při měření exprese B2M



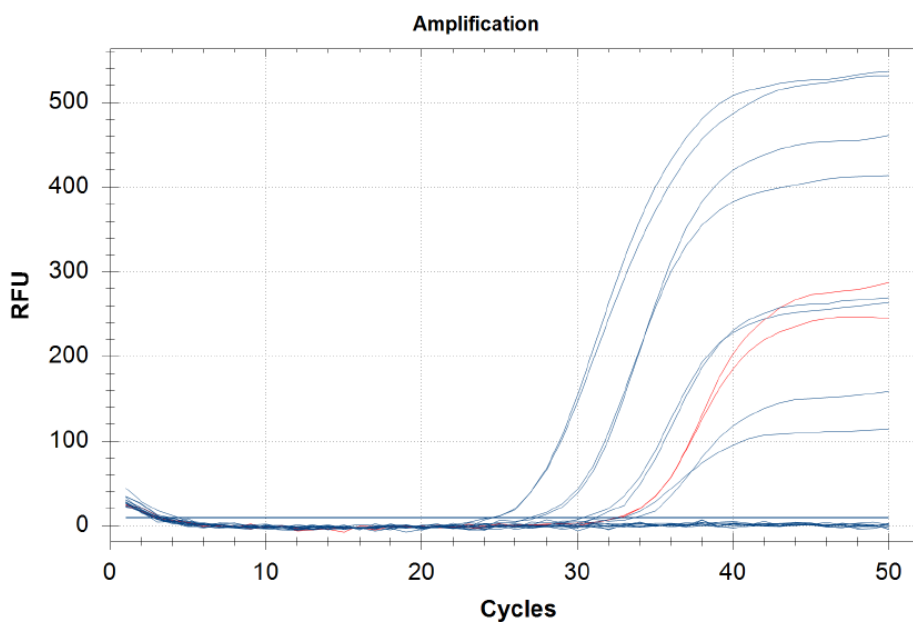
Graf 2 Příklad podoby standardní křivky získané za pomoci qPCR při měření exprese B2M

Po vyloučení vzorků s nedostatečnou kvalitou jsem u všech zbývajících vzorků provedl qPCR zaměřenou na detekci exprese genu *ALK* (4.6 Kvantitativní PCR). Tato metoda využívala specifickou sondu, která se váže výhradně na oblast cDNA kódující protein *ALK*. V současnosti se tato metoda rutinně uplatňuje v Laboratoři molekulární patologie Fakultní nemocnice v Motole pro detekci minimální diseminované nemoci. Její hlavní výhodou oproti

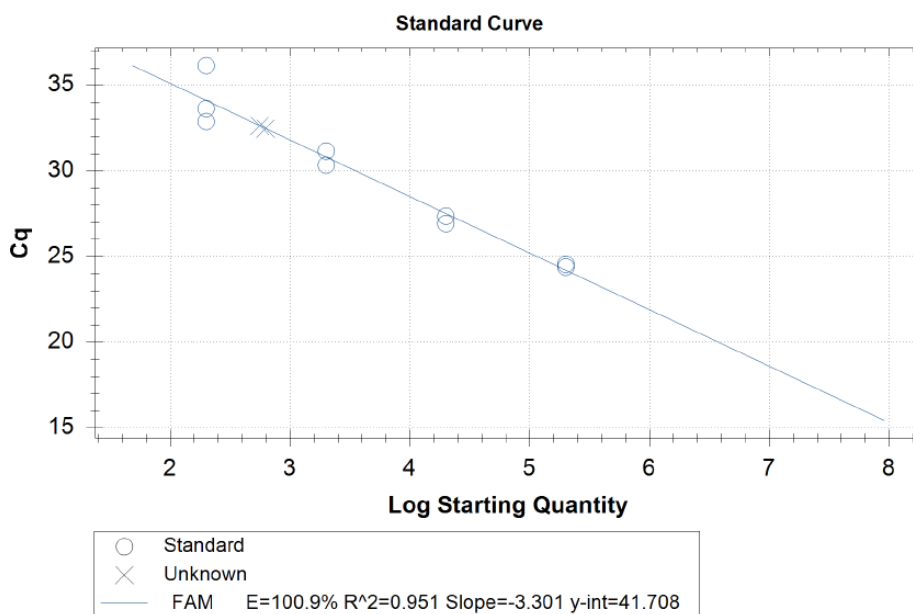
metodám, jejichž sonda je navržena pro detekci specifického místa fúze genů *ALK* a *NPM1*, je možnost jejího použití i u pacientů, u nichž má gen *ALK* jiného fúzního partnera.

Po ukončení amplifikační reakce jsem nejprve vyhodnotil parametry standardní křivky, přičemž jsem se řídil kritériem, podle něhož se hodnota sklonu této křivky musí nacházet v rozmezí -3,1 až -3,9. Dalším důležitým ukazatelem správného průběhu qPCR reakce byl rozdíl v hodnotách C_q mezi jednotlivými členy ředící řady. Vzhledem k tomu, že jsem při přípravě této řady aplikoval dekadické ředění, očekával jsem, že se naměřené hodnoty C_q mezi jednotlivými ředěními budou lišit přibližně o 3,3 cyklu, což odpovídá teoretickému předpokladu vyplývajícímu z logaritmické povahy amplifikace při 100 % amplifikační efektivitě.

Ze 108 vzorků cDNA, které vykazovaly dostatečnou kvalitu, jsem detekoval pozitivní expresi genu *ALK* u 33 vzorků. Z těchto 33 pozitivních vzorků pocházelo 15 z periferní krve, 10 z kostní dřeně a 8 z primárního tumoru (Tabulka 7).



Graf 3 Příklad podoby amplifikačních křivek získaných za pomoci qPCR při měření exprese *ALK*



Graf 4 Příklad podoby standardní křivky získané za pomoci qPCR při měření exprese ALK

Pro analýzu pomocí dPCR jsem u všech vzorků stanovil koncentraci cDNA (viz 4.5 Měření koncentrace). Naměřené hodnoty koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 0,49 ng/μl do 110 ng/μl, přičemž průměrná koncentrace činila 31,76 ng/μl a medián byl 24,40 ng/μl. Pro následné využití vzorků cDNA v dPCR jsem vzorky rozdělil do dvou skupin podle koncentrace: na vzorky s koncentrací ≤ 20 ng/μl a na vzorky s koncentrací > 20 ng/μl. Do první skupiny spadalo 46 vzorků, zatímco do druhé skupiny bylo zařazeno 62 vzorků.

Toto rozdělení bylo nezbytné z důvodu dodržení parametrů stanovených v pracovním protokolu, podle něhož bylo do každé reakce přidáváno 2,5 μl vzorku, přičemž tento objem nesměl obsahovat více než 50 ng cDNA. Limit 50 ng cDNA byl stanoven s cílem zajistit optimální distribuci molekul do jednotlivých nanojamek, aby v každé nanojamce byla s vysokou pravděpodobností přítomna buď žádná, nebo právě jedna molekula cílové cDNA. Překročení tohoto množství by vedlo ke zvýšení pravděpodobnosti přítomnosti více molekul cDNA v jediné nanojamce, což by mohlo způsobit chybný výpočet absolutní kvantifikace analyzovaného vzorku a vedlo by k přesycení reakce.

V případech, kdy 2,5 μl vzorku obsahovalo více než 50 ng cDNA, jsem provedl odpovídající ředění za účelem snížení koncentrace cDNA na požadovanou úroveň (viz 4.7 Digitální PCR).

Následně jsem u všech vzorků cDNA provedl dPCR zaměřenou na detekci exprese mutovaného fúzního genu *NPM1::ALK* (viz 4.7 Digitální PCR). Tuto metodiku jsem zvolil,

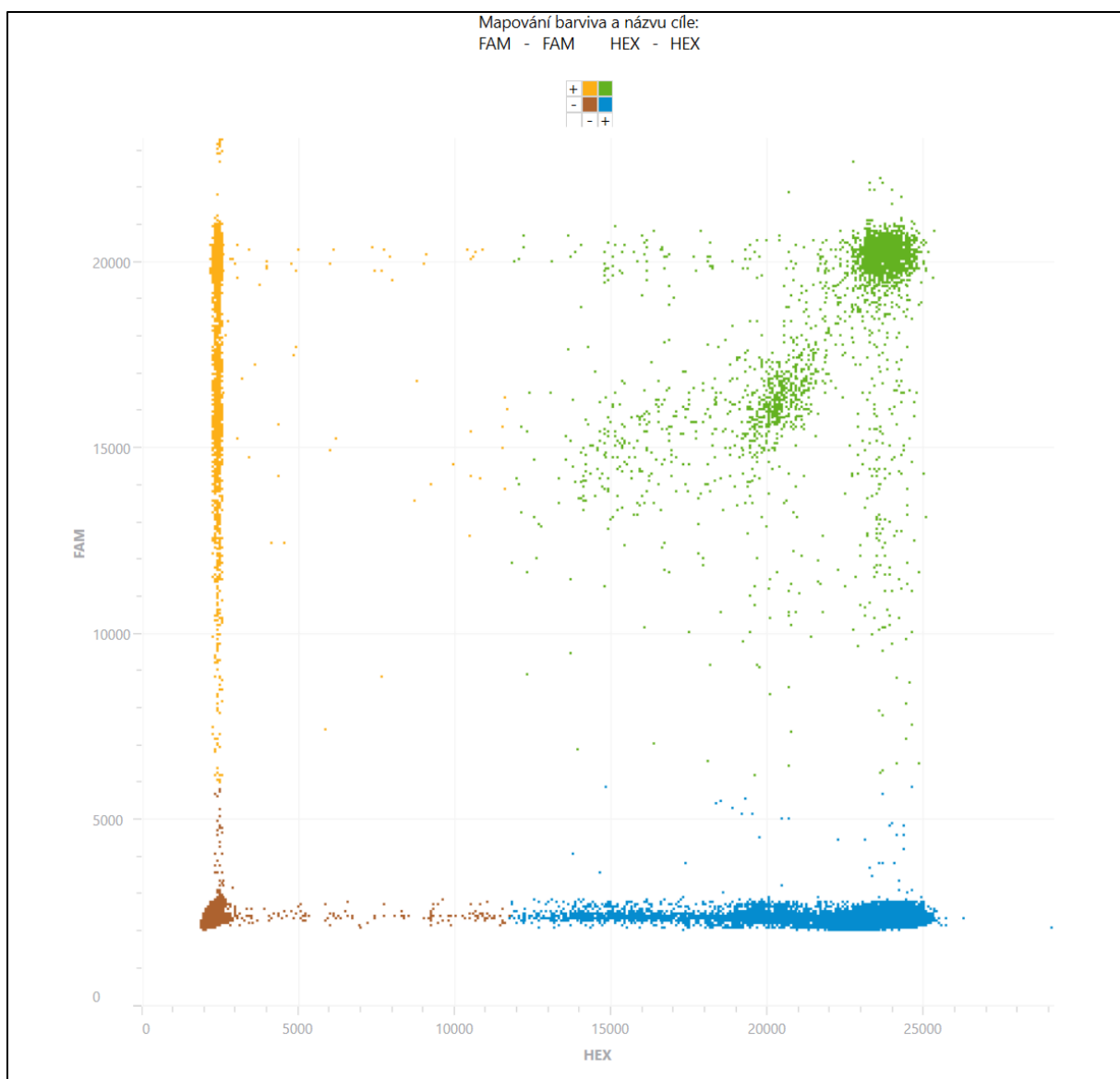
protože analýza exprese genu *ALK* pomocí sond a primerů navržených pro qPCR se při aplikaci v rámci dPCR projevila jako nehodnotitelná.

Expresi *NPM1::ALK* jsem detekoval prostřednictvím multiplexní reakce společně s referenčním genem *ABL1*, který kóduje Abelsonovu tyrosin kinázu 1. Tento gen je díky své stabilní expresi v hematopoetických buňkách široce využíván v diagnostice hematologických malignit. Stejně jako v případě detekce *NPM1::ALK* jsem volbu *ABL1* jako referenčního genu odůvodnil mezinárodně doporučeným protokolem (International collaborative treatment protocol for children and adolescents with ALCL), jehož cílem je postupná implementace jednotného diagnostického postupu napříč evropskými pracovišti. Cílem této standardizace je umožnit srovnatelnou detekci fúzního genu *NPM1::ALK*, a to především vzhledem k jeho potenciálnímu využití při sledování MRN, cílené terapii a zapojení do mezinárodních programů externí kontroly kvality.

Vzhledem k tomu, že exprese genu *ALK* je specifická pouze pro určité typy nádorových onemocnění spojené s jeho mutací, není jeho exprese detekována při vyšetření periferní krve, kostní dřeně ani primárního tumoru u pacientů s jinými typy malignit nebo u zdravých jedinců. Z tohoto důvodu jsem mohl analýzu exprese genu *ALK* nahradit detekcí fúzního transkriptu *NPM1::ALK*, aniž by hrozila interference fyziologickou expresí genu *ALK*, čímž jsem eliminoval riziko zkreslení výsledků.

V tomto kontextu však představovalo nahrazení referenčního genu *B2M* genem *ABL1* určitou metodologickou nevýhodu, protože znemožnilo přímé porovnání absolutní kvantifikace mezi výsledky získanými metodami qPCR a dPCR.

Pomocí dPCR jsem detekoval expresi cDNA kódující fúzní gen *NPM1::ALK* u 37 ze 108 vzorků. Z těchto 37 pozitivních vzorků pocházelo 17 z periferní krve, 12 z kostní dřeně a 8 z primárního tumoru (Tabulka 7).



Graf 5 Podoba 2D rozptylového grafu získaného za pomoci dPCR, žluté body reprezentují nanojamky, které vyšli pozitivní pouze na expresi fúzního genu *NPM1::ALK*, v případě modrých bodů se jednalo o nanojamky, které vyšli pozitivní na expresi pouze genu *ABL1*, zelené nanojamky vyšli pozitivní na expresi obou sledovaných genů a u hnědých jamek nebyla naměřená exprese ani u jednoho ze sledovaných genů.

Při porovnání výsledků získaných metodami qPCR a dPCR jsem detekoval expresi *NPM1::ALK* u 41 vzorků cDNA. Z tohoto počtu byla exprese genu zaznamenána u 29 vzorků oběma metodami, u 8 vzorků pouze metodou dPCR a u 3 vzorků výhradně metodou qPCR. U zbývajících 68 vzorků cDNA nebyla exprese *NPM1::ALK* detekována žádnou z těchto dvou metod (Tabulka 7).

V rámci skupiny 29 vzorků cDNA, u nichž byla exprese *NPM1::ALK* pozorována oběma metodami, pocházelo 13 vzorků z periferní krve, 8 z kostní dřeně a 8 z primárního tumoru. V případě vzorků cDNA z primárních nádorů bylo očekávatelné, že dojde k detekci exprese *NPM1::ALK* oběma metodami PCR, jelikož se jedná o diagnostické vzorky obsahující ve srovnání se vzorky periferní krve či kostní dřeně vyšší počet nádorových buněk. Při dostatečné kvalitě těchto vzorků je exprese fúzního genu v nádorové tkáni přítomna a spolehlivě detekovatelná.

Naopak vzorky periferní krve a kostní dřeně jsou často odebírány i po ukončení primární terapie v rámci sledování MRN, aby bylo možné včas identifikovat případný relaps nádorového onemocnění. Z tohoto důvodu vykazují tyto typy vzorků výraznou variabilitu v počtu přítomných nádorových buněk, která závisí na aktuálním klinickém stavu pacienta. To má přímý dopad na množství cDNA s detekovatelnou změnou přítomnou ve vzorku, a tím i na možnost detekce exprese sledovaného genu.

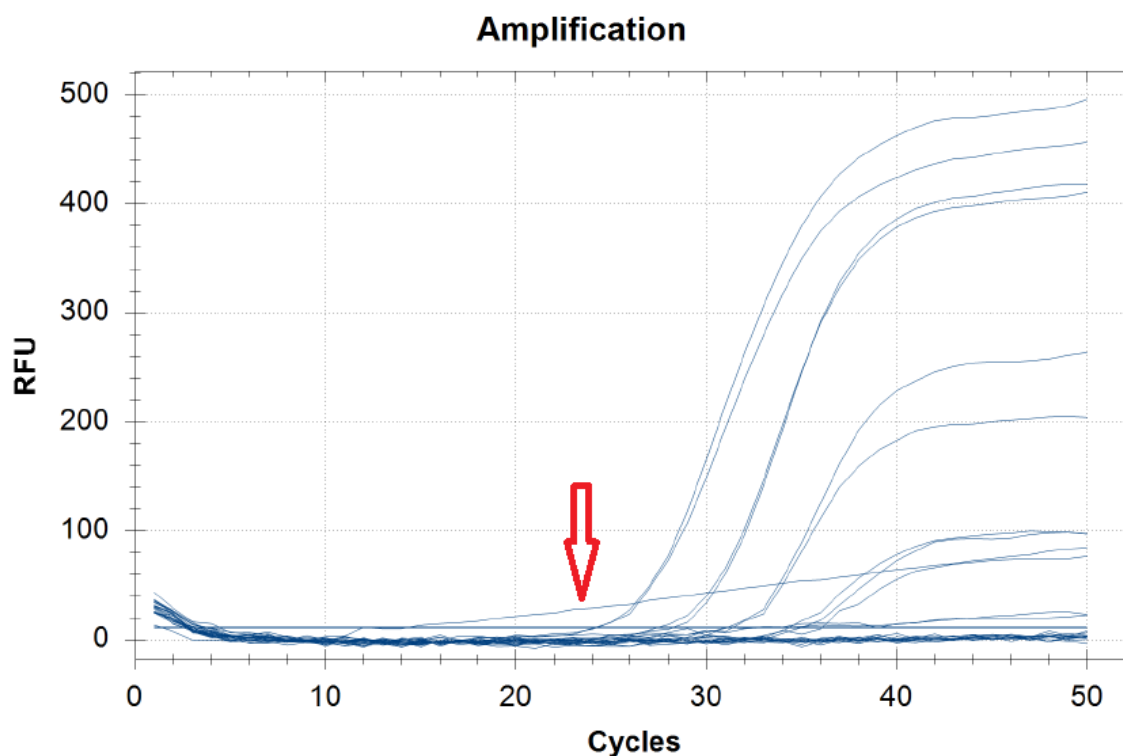
U skupiny 8 vzorků cDNA, u nichž byla exprese *NPM1::ALK* detekována výhradně metodou dPCR, pocházely 4 vzorky z periferní krve a 4 z kostní dřeně. U všech těchto vzorků jsem naměřil velmi nízkou koncentraci sledovaného genu, která se pohybovala v rozmezí od 0,5775 do 47,03 kopie/ μ l. Tato nízká koncentrace pravděpodobně představovala důvod, proč jsem exprese detekoval pouze prostřednictvím dPCR. Vzhledem k tomu, že v rámci dPCR dochází k amplifikaci v mnoha oddělených nanojamkách, umožňuje tato metoda provést absolutní kvantifikaci bez nutnosti využití standardní křivky. Díky tomu je možné detekovat i jedinou kopii cílové cDNA. Naproti tomu metoda qPCR má nižší citlivost, a je proto pravděpodobné, že takto nízké množství sledované cDNA nebylo dostatečné k překročení prahu detekce.

Pro ověření, zda je metoda dPCR skutečně citlivější než qPCR, jsem použil vzorek cDNA pocházející z primárního tumoru (Vzorek č.41), který jsem nejprve naředil tak, aby odpovídal optimálnímu množství 50 ng pro dPCR. Tento upravený vzorek jsem následně podrobil dekadickému ředění až do koncentrace odpovídající ředění 10^{-6} a všechna připravená ředění jsem poté testoval pomocí metod dPCR a qPCR. Při použití dPCR jsem detekoval expresi *NPM1::ALK* až do ředění 10^{-4} , zatímco v případě qPCR byla exprese *NPM1::ALK* detekovatelná pouze do ředění 10^{-3} . Na základě těchto výsledků jsem mohl konstatovat, že metoda dPCR vykazuje ve srovnání s qPCR vyšší citlivost.

Poslední skupinu pozitivních vzorků tvořily 3 vzorky cDNA, u nichž byla exprese genu *ALK* detekována výhradně pomocí metody qPCR. Z těchto vzorků pocházely dva z periferní krve a jeden z kostní dřeně. Na rozdíl od případů, kdy byla exprese *NPM1::ALK* detekována výlučně metodou dPCR, nebylo v tomto případě možné jednoznačně určit příčinu rozdílné detekce.

U všech tří vzorků byla naměřena vysoká koncentrace cDNA, která se pohybovala v rozmezí 29,40 až 78 ng/μl. Pokud by počet kopií sledované cDNA ve vzorcích byl velmi nízký, bylo by možné za důvod pozorovatelnosti exprese *NPM1::ALK* výlučně metodou qPCR považovat nutnost ředění těchto vzorků před aplikací do dPCR reakce tak, aby přidané množství cDNA odpovídalo maximálním povoleným 50 ng. Absolutní kvantifikace metodou qPCR ukázala, že množství cílové cDNA ve vzorcích se pohybovalo v rozmezí 62,98 až 12506,99 kopií na μl, nicméně po normalizaci hodnot ke referenčnímu genu *B2M* byly hodnoty velmi nízké, a to v rozmezí 3,98 e-6 až 9,81e-3, což svědčí pro nízkou koncentraci sledovaného transkriptu.

Za pravděpodobnou příčinu negativního výsledku v dPCR zřejmě nelze označit přítomnost inhibitorů reakce, neboť dPCR, díky rozdělení reakční směsi do velkého počtu samostatných nanojamek, vykazuje ve srovnání s qPCR vyšší odolnost vůči možným inhibičním vlivům.



Graf 6 Příklad inhibice u qPCR, přičemž vzorek cDNA, u kterého došlo k inhibici je označen červenou šipkou. V případě takovýchto vzorků není jasné, zda u nich skutečně dochází k expresi genu ALK a jejich měření muselo být opakováno.

Tabulka 7 Přehled, které porovnávání qPCR a dPCR vyšli pozitivní alespoň u jedné z těchto metod, vzorky cDNA označené červeně vyšly pozitivně pouze při použití dPCR, a vzorky označené modře vyšly pozitivně pouze při použití qPCR

Číslo vzorku	Označení pacienta	Typ vzorku	Koncentrace (ng/ul)	qPCR	dPCR
				Poměr počtu kopií ALK /B2M	Poměr počtu kopií NPM1::ALK /ABL1
1	Pacient č.1	prim. T	7,08	0,769819324	1,036978111
4	Pacient č.1	perif. krev	32,8	0	0,000559797
8	Pacient č.2	prim. T	61,2	0,224194292	1,983752830
11	Pacient č.2	KD	29,4	0,009806296	0
15	Pacient č.3	prim. T	6,4	2,758919799	0,569375980
30	Pacient č.5	KD	32	0	0,001038314
41	Pacient č.6	prim. T	21	0,297343832	0,899887012

43	Pacient č.7	prim. T	42	0,915954656	3,558411684
44	Pacient č.7	perif. krev	40,8	0	0,001061252
46	Pacient č.7	perif. krev	17,5	0,000175017	0,000434769
47	Pacient č.7	perif. krev	36,2	0,000003981	0
56	Pacient č.8	perif. krev	78	0,000304882	0
57	Pacient č.9	perif. krev	10,6	0,000328039	0,015389790
58	Pacient č.9	KD	6,26	0,000409665	0,001113775
59	Pacient č.9	perif. krev	33,4	0	0,000566752
60	Pacient č.9	perif. krev	10,6	0,000743639	0,005361459
61	Pacient č.9	perif. krev	35,6	0,000091682	0,000328555
66	Pacient č.10	perif. krev	42,4	0,007432376	0,035604616
68	Pacient č.10	KD	40,8	0,004635805	0,016290828
71	Pacient č.11	perif. krev	3,26	0,010575695	0,257328326
72	Pacient č.11	perif. krev	6,32	0,060058197	0,190797631
73	Pacient č.11	perif. krev	19	0,000809771	0,010559553
74	Pacient č.11	perif. krev	36,8	0,000035193	0,000467077
75	Pacient č.11	perif. krev	9,08	0	0,000177171
79	Pacient č.12	KD	48,2	0	0,000123764
80	Pacient č.12	KD	49	0	0,000236485
92	Pacient č.14	prim. T	16,5	0,356279954	0,900143762
93	Pacient č.14	KD	106	0,030991529	0,054757628
94	Pacient č.14	KD	110	0,409821281	0,119972239
95	Pacient č.14	KD	92,8	0,108559032	0,116766313
96	Pacient č.14	KD	25,8	0	0,003240840
99	Pacient č.15	prim. T	15,4	0,037042252	0,259265738
102	Pacient č.15	KD	12,9	0,000121225	0,000753277
106	Pacient č.16	prim. T	16,4	0,470244829	3,109279605
107	Pacient č.16	perif. krev	57	0,023658352	0,582322269
108	Pacient č.16	KD	70,4	0,043933744	0,155727614
109	Pacient č.16	KD	58,6	0,065241078	0,119942956
110	Pacient č.16	perif. krev	13,5	0,000019018	0,109373285
111	Pacient č.16	perif. krev	38,55	0,012379721	0,442427472
112	Pacient č.16	perif. krev	28,8	0,033058016	0,910110950

Pro otestování, zda mezi těmito dvěma metodami existuje statisticky významná závislost jsem využil metodu Chí-kvadrátový test nezávislosti, přičemž podle nulové hypotézy jsou výsledky metody nezávislé na výsledcích druhé metody. Naopak při použití alternativní hypotézy nejsou výsledky metody nezávislé na výsledcích druhé metody, tedy metodou dPCR a metodou qPCR existuje statisticky významný rozdíl v jejich schopnosti detekovat pozitivní výsledky.

Tabulka 8 Přehled pozorovaných četností (O_{ij}) pozitivních a negativních vzorků cDNA testovaných za pomoci dPCR a qPCR.

	Metoda qPCR +	Metoda qPCR -	Celkem (řádkový součet)
Metoda dPCR +	29	8	37
Metoda dPCR -	3	68	71
Celkem (sloupcový součet)	32	76	108

Z předchozí tabulky (Tabulka 8) jsem pro všechny členy vypočítal očekávanou četnost. Členy jsou v tomto kontextu chápány jako skupiny vzorků, které vykázaly pozitivní výsledek při použití obou metod, dále skupiny vzorků, které byly pozitivní pouze při použití dPCR, avšak negativní při qPCR, dále vzorky, jež byly pozitivní pouze při použití qPCR a negativní při dPCR, a nakonec skupina vzorků, která nevykázala pozitivitu při použití ani jedné z detekčních metod.

Vzorec pro výpočet očekávaných četností (E_{ij}):

$$E_{ij} = \frac{(\text{součet řádku } i) \times (\text{součet sloupce } j)}{\text{celkový počet pozorování}}$$

Výpočet očekávaných četností u jednotlivých členů:

Očekávaná četnost pro (Metoda dPCR+, Metoda qPCR+): $E_{11}=37 \times 32 / 108 \approx 10,96$

Očekávaná četnost pro (Metoda dPCR+, Metoda qPCR-): $E_{12}=37 \times 76 / 108 \approx 26,04$

Očekávaná četnost pro (Metoda dPCR-, Metoda qPCR+): $E_{21}=71 \times 32 / 108 \approx 21,04$

Očekávaná četnost pro (Metoda dPCR-, Metoda qPCR-): $E_{22}=71 \times 76 / 108 \approx 49,96$

Za pomoci dat získaných výpočtem očekávaných četností a dat nacházejících se v předchozí tabulce jsem následně vypočítal χ^2 .

Vzorec pro výpočet Chí-kvadrát statistiky (χ^2):

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

χ^2 – Chí-kvadrát statistika

O_{ij} – pozorovaná četnost v i-tém řádku a j-tém sloupci

E_{ij} – očekávaná četnost v i-tém řádku a j-tém sloupci.

Výpočet jednotlivých členů χ^2 :

$$(\text{Metoda dPCR+}, \text{Metoda qPCR+}): \frac{(29-10,96)^2}{10,96} \approx 29,69$$

$$(\text{Metoda dPCR+}, \text{Metoda qPCR-}): \frac{(8-26,04)^2}{26,04} \approx 12,50$$

$$(\text{Metoda dPCR-}, \text{Metoda qPCR+}): \frac{(3-21,04)^2}{21,04} \approx 15,47$$

$$(\text{Metoda dPCR-}, \text{Metoda qPCR-}): \frac{(68-49,96)^2}{49,96} \approx 6,51$$

$$\text{Výpočet } \chi^2: 29,69 + 12,50 + 15,47 + 6,51 \approx 64,17$$

Podle následujícího vzorce jsem za pomoci předchozí tabulky (Tabulka 8) vypočítal stupeň volnosti pro toto statistické měření.

Vzorec pro určení stupňů volnosti (df):

$$df = (r - 1) \times (c - 1)$$

df = stupně volnosti

r = počet řádků

c = počet sloupců

$$\text{Výpočet df: } df = (2-1) \times (2-1) = 1$$

Po dosazení hodnot $df = 1$ a $\chi^2 = 64,17$ do statistické tabulky pro Chí-kvadrátový test nezávislosti bylo zjištěno, že p-hodnota je $< 0,00001$. Na základě těchto dat tedy mohu zavrhnout nulovou hypotézu, což znamená, že existuje statisticky významná asociace mezi výsledky dPCR a qPCR.

5.2 Porovnání použití vzorků periferní krve a kostní dřeně při sledování MRN u pacientů s ALK+ ALCL

V rámci této části diplomové práce jsem porovnával expresi *NPM1::ALK* ve vzorcích cDNA pocházejících z kostní dřeně a periferní krve za pomoci dPCR. Z teoretického hlediska by cDNA izolovaná z kostní dřeně měla představovat vhodnější materiál pro analýzu MRN u pacientů s ALCL, a to vzhledem k předpokládanému vyššímu obsahu nádorových buněk ve srovnání se vzorky periferní krve. Nevýhodou použití tohoto typu materiálu je však výrazně vyšší invazivita odběru ve srovnání s odběrem periferní krve.

Abych minimalizoval možné odchylky způsobené časovou proměnlivostí exprese *NPM1::ALK*, zahrnul jsem do analýzy pouze párové vzorky cDNA z kostní dřeně a periferní krve odebrané ve stejném kalendářním dni. Tato metodologická podmínka však představovala komplikaci, neboť v rámci rutinního monitoringu MRN byly ve většině případů k dispozici pouze vzorky jednoho typu biologického materiálu. V důsledku toho bylo obtížné získat dostatečné množství párových vzorků pro následnou analýzu.

Celkově jsem zpracoval 32 vzorků cDNA, z nichž 16 pocházelo z kostní dřeně a 16 z periferní krve. Z těchto 16 párových souborů nevykazovalo devět žádnou detekovatelnou expresi *NPM1::ALK* ani v jednom z materiálů. U čtyř dvojic byla exprese *NPM1::ALK* detekována jak ve vzorcích z kostní dřeně, tak z periferní krve. U zbývajících tří dvojic byla exprese detekována výlučně ve vzorcích cDNA z kostní dřeně. V žádném z analyzovaných případů jsem nezaznamenal detekovatelnou expresi *NPM1::ALK* pouze ve vzorcích z periferní krve.

Ačkoli by se na základě vyššího obsahu nádorových buněk dala očekávat vyšší míra exprese *NPM1::ALK* ve vzorcích z kostní dřeně, v případě čtyř vzorkových dvojic, u nichž byla detekována exprese *NPM1::ALK* v obou materiálech, jsem ve třech případech zaznamenal vyšší exprese ve vzorcích pocházejících z periferní krve. Tento fenomén nebyl způsoben nízkou koncentrací cDNA, neboť u sedmi z osmi vzorků bylo použito optimální

množství vstupní cDNA, tedy 50 ng. Výjimku tvořil jeden vzorek z periferní krve, který obsahoval pouze 33,5 ng cDNA, avšak vykazoval vyšší expresi *NPM1::ALK*, odpovídající 124,56 kopie/μl, než jeho párový vzorek z kostní dřeně s 50 ng cDNA, v němž bylo detekováno pouze 12,73 kopie/μl.

V případě skupiny tří dvojic vzorků cDNA, u nichž byla exprese *NPM1::ALK* detekována výhradně ve vzorcích pocházejících z kostní dřeně, nastávaly při interpretaci těchto dat určité komplikace. Ačkoli se nevyskytl žádný případ, v němž by byla exprese *NPM1::ALK* pozorována pouze ve vzorcích periferní krve, celkový počet pozitivních vzorků byl příliš nízký na to, aby bylo možné z těchto výsledků vyvozovat statisticky podložené závěry.

Další problém představovala nízká koncentrace cDNA u dvou vzorků periferní krve – konkrétně se u vzorku č. 19 koncentrace pohybovala pouze na úrovni 8,22 ng/μl a u vzorku č. 23 dokonce jen 4 ng/μl. Vzhledem k tomu, že u jejich příslušných protějšků z kostní dřeně (vzorek č. 20 a č. 24) bylo při použití optimálního množství 50 ng cDNA naměřeno pouze 0,5385 a 1,1928 kopie/μl *NPM1::ALK*, je možné předpokládat, že pokud by vzorky č. 19 a č. 23 dosahovaly dostatečné koncentrace cDNA pro použití standardního množství 50 ng, mohly by rovněž vykazat pozitivní expresi *NPM1::ALK*.

Na základě těchto výsledků tak nebylo možné jednoznačně posoudit, zda je pro monitorování MRN vhodnější použití periferní krve nebo kostní dřeně. Přestože ve více případech byla pozitivita exprese *NPM1::ALK* detekována ve vzorcích kostní dřeně, ve třech ze čtyř případů, kdy byla exprese pozorována u obou typů vzorků, byla vyšší počáteční koncentrace cílové cDNA zaznamenána ve vzorcích pocházejících z periferní krve. Současně nelze vyloučit, že výsledky byly částečně zkresleny právě nízkou koncentrací cDNA ve dvou vzorcích periferní krve, což mohlo zvýhodnit jejich protějšky z kostní dřeně.

Tento experiment byl navíc limitován nízkým počtem vzorků cDNA s pozitivní expresí *NPM1::ALK*, které pocházely z periferní krve a kostní dřeně a byly odebrány ve shodném datu. Z tohoto důvodu by bylo vhodné analýzu v budoucnu zopakovat za předpokladu, že bude možné získat větší počet pozitivních párových vzorků, které by umožnily přesnější vyhodnocení.

Tabulka 9 Výsledky získané při porovnávání použití vzorků pocházejících z kostní dřeně (KD) a periferní krve

Číslo vzorku	Označení pacienta	Datum izolace	Typ vzorku	Koncentrace (ng/μl)	ALK (kopie/μl)
1	Pacient č.2	4. července 2022	perif. krev	9,56	0
2	Pacient č.2	4. července 2022	KD	29,4	0
3	Pacient č.2	5. prosince 2022	perif. krev	8,68	0
4	Pacient č.2	5. prosince 2022	KD	96,2	0
5	Pacient č.3	23. července 2021	perif. krev	2,88	0
6	Pacient č.3	23. července 2021	KD	4,22	0
7	Pacient č.3	18. května 2022	perif. krev	19,1	0
8	Pacient č.3	18. května 2022	KD	66,2	0
9	Pacient č.5	30. července 2020	perif. krev	32,8	0
10	Pacient č.5	30. července 2020	KD	32	0,5924
11	Pacient č.6	25. června 2020	perif. krev	55	0
12	Pacient č.6	25. června 2020	KD	14	0
13	Pacient č.6	11. května 2020	perif. krev	37,2	0
14	Pacient č.6	11. května 2020	KD	84,4	0
15	Pacient č.7	12. března 2020	perif. krev	13,4	124,555
16	Pacient č.7	12. března 2020	KD	40	12,7306
17	Pacient č.11	9. července 2020	perif. krev	5,28	0
18	Pacient č.11	9. července 2020	KD	37	0
19	Pacient č.11	13. srpna 2020	perif. krev	8,22	0
20	Pacient č.11	13. srpna 2020	KD	67,4	0,5385
21	Pacient č.11	18. září 2020	perif. krev	50,8	0
22	Pacient č.11	18. září 2020	KD	15,5	0
23	Pacient č.12	19. prosince 2018	perif. krev	4	0
24	Pacient č.12	19. prosince 2018	KD	48,2	1,1928
25	Pacient č.12	3. června 2019	perif. krev	22,2	0
26	Pacient č.12	3. června 2019	KD	50,2	0
27	Pacient č.16	18. července 2024	perif. krev	57	228,9342
28	Pacient č.16	18. července 2024	KD	70,4	371,8861
29	Pacient č.16	28. srpna 2024	perif. krev	28,8	652,9487
30	Pacient č.16	28. srpna 2024	KD	45	137,8577
31	Pacient č.16	3. října 2024	perif. krev	24,8	736,8685
32	Pacient č.16	3. října 2024	KD	36,6	273,9542

5.3 Sledování korelace mezi změnou MRN a klinickým stavem pacienta s diagnózou ALK+ ALCL v čase

V rámci této části diplomové práce jsem pomocí dPCR retrospektivně sledoval změny v expresi *NPM1::ALK* ve vzorcích odebraných v průběhu léčby a po jejím ukončení, a to za účelem monitorování případného výskytu relapsu a zhodnocení možné korelace těchto změn exprese se změnami klinického stavu daného pacienta. Za účelem sledování této korelace jsem analyzoval průběh léčby u dvou pacientů označených jako Pacient č. 11 a Pacient č. 16.

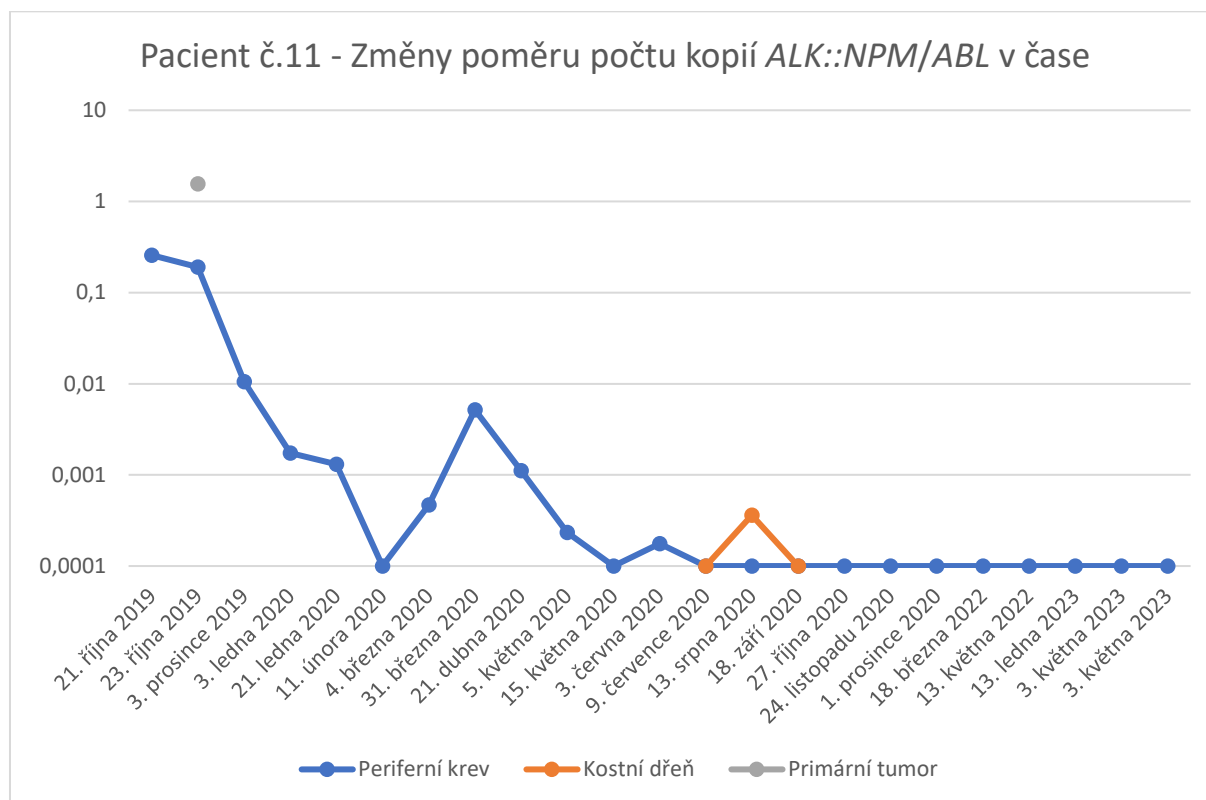
Pacienta č. 11 jsem zvolil, protože během jeho léčby došlo k opakovaným změnám klinického stavu zahrnujícím jak jeho zhoršení, tak následné zlepšení, které se potenciálně mohly odrazit v hladině exprese *NPM1::ALK*. Pacient č. 16 se na rozdíl od ostatních nacházel v době zpracovávání této diplomové práce stále v aktivní fázi léčby, přičemž jeho onemocnění mělo refrakterní charakter, tedy nereagovalo na standardní léčebný protokol. Z tohoto důvodu byla u něj zvolena alternativní terapeutická strategie.

Získaná data od obou pacientů jsem analyzoval pomocí absolutní kvantifikace s normalizací na referenční gen *ABL1* a paralelně také bez této normalizace. Tento přístup jsem zvolil rovněž za účelem ověření a s vysokou pravděpodobností i vyvrácení hypotézy vzniklé v laboratoři, podle níž není při použití dPCR nutné provádět normalizaci výsledků k referenčnímu genu. Obě metody kvantifikace jsem následně graficky znázornil a výsledné grafy porovnal s cílem posoudit míru odlišnosti.

U Pacienta č. 11 jsem testoval expresi *NPM1::ALK* u celkem 26 vzorků cDNA odebraných v období od 21. října 2019 do 3. května 2023. Z těchto vzorků pocházelo 23 z periferní krve, 3 z kostní dřeně a 1 z primárního tumoru. Po provedení amplifikace zkoumané cDNA bylo 12 vzorků vyhodnoceno jako pozitivní na expresi *NPM1::ALK*. Naměřené hodnoty udávající počet kopií/ μ l cDNA kódující *NPM1::ALK* nebo *ABL1* jsem následně vydělil množstvím použité cDNA v ng a vynásobil hodnotou 50. Tento krok byl nezbytný, protože u 8 z 12 pozitivních vzorků cDNA nedosahovala koncentrace požadované hodnoty pro aplikaci optimálního množství 50 ng cDNA, jak stanovuje protokol, a tudíž výsledné hodnoty odpovídaly množství reálně použité cDNA a nikoliv optimálním 50 ng. Tento přepočít byl nutný pro správné zpracování dat v rámci absolutní kvantifikace.

Všechna data uvedená v tabulce, která je součástí přílohy této diplomové práce (Tabulka 13), jsem následně zpracoval do grafu (Graf 7), jenž jsem porovnal s dostupnými

lékařskými záznamy pacienta za účelem zhodnocení korelace hladiny exprese fúzního genu *NPM1::ALK* s jeho aktuálním klinickým stavem.



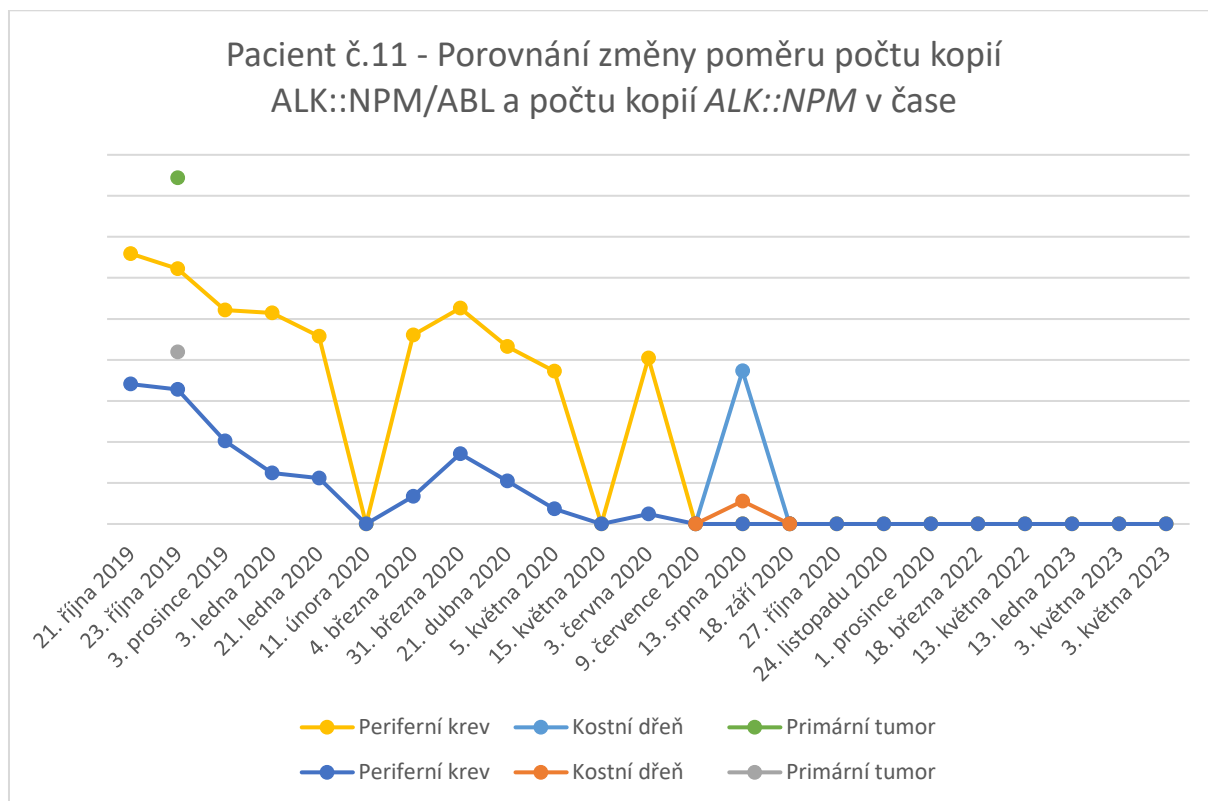
Graf 7 Změny počtu kopií fúzního genu *NPM1::ALK*, vztažených ke kontrolnímu genu *ABL1* u pacienta s *ALK+ ALCL* (Pacient č.11)

Pacient č. 11 byl diagnostikován *ALK+ ALCL* dne 18. října 2019 a podstoupil standardní indukční chemoterapii, která vedla ke krátkodobé remisi. Nicméně dne 30. března 2020 došlo k prvnímu relapsu onemocnění, což vyžadovalo eskalaci léčby. Vzhledem k relapsu byla indikována alogenní transplantace periferních krvetvorných buněk (allo PBPC), která byla provedena dne 10. června 2020. Po transplantaci pacient absolvoval dlouhodobé sledování a ke dni 8. ledna 2025 je pacient v kompletní remisi, což znamená, že nejsou detekovatelné známky aktivního onemocnění.

V případě tohoto pacienta je na předchozím grafu (Graf 7) je dobře pozorovatelná korelace mezi klinickým stavem pacienta a množstvím kopií *NPM1::ALK*, kdy v případě prvotní léčby vedoucí ke krátkodobě remisi docházelo k postupnému snižování množství kopií cDNA kódující gen *NPM1::ALK* a zároveň ke snižování této cDNA v poměru k cDNA kódující gen *ABL1*. Dále je zde pozorovatelné zvyšování množství kopií cDNA pro

NPM1::ALK v době, kdy u pacientky došlo k relapsu a k jejímu snižování v průběhu následné léčby. Po alogenní transplantaci jsou zde pozorovatelné 2 nárůsty počtu kopií, které mohou být vysvětleny tím, že pacientce byly podávány imunosupresiva, aby došlo k zabránění reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease, GvHD). Kromě těchto dvou nárůstů se počet kopií cDNA pro *NPM1::ALK* vždy rovnal 0, což odpovídá klinickému stavu pacienta, u kterého poté už k žádnému dalšímu relapsu nedošlo. Ke dni 8. ledna 2025 pacientka zůstává v kompletní klinické remisi.

V následujícím grafu (Graf 8) jsem porovnal dynamiku poměru kopií *NPM1::ALK/ABL1* v čase, tedy analýzu s využitím normalizačního genu, a vývoj absolutního počtu kopií *NPM1::ALK* v čase bez využití referenčního genu. Přestože mezi těmito dvěma spojnici existovaly rozdíly, pozoroval jsem konzistentní trend ve změně hodnot – poklesy či nárůsty v jednom grafu byly provázeny obdobnými změnami ve druhém grafu.



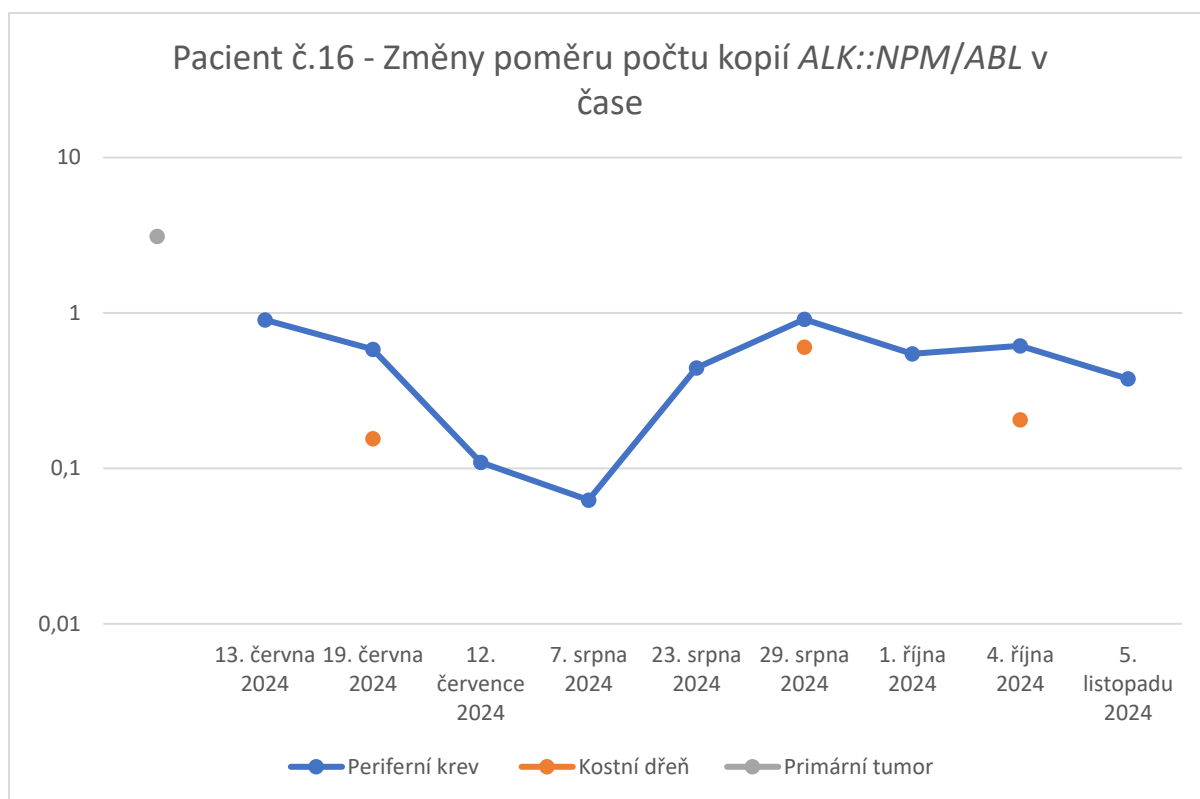
Graf 8 Porovnání změny v podobě grafů u měření MRN v čase při použití referenčního genu (spodní graf, jehož prvky jsou označeny tmavě modře, oranžově a šedě) a bez použití referenčního genu (horní graf, jehož prvky jsou označeny žlutě, světle modře a zeleně) (Pacient č.11)

V případě Pacienta č. 16 jsem testoval expresi *NPM1::ALK* u 14 vzorků odebraných v období od 13. června 2024 do 5. listopadu 2024. Z těchto vzorků pocházelo 9 z periferní krve, 4 z kostní dřeně a 1 z primárního nádoru odebraného v době stanovení diagnózy. Na rozdíl od ostatních pacientů zahrnutých do této diplomové práce byl Pacient č. 16 diagnostikován recentně, což vysvětlovalo nižší počet dostupných vzorků pro analýzu oproti předchozímu případu.

Všechny analyzované vzorky vyšly pozitivní na expresi *NPM1::ALK*, což souviselo s refrakterním charakterem onemocnění, kdy pacient nereagoval na standardní léčbu, a monitoring byl prováděn výhradně v průběhu terapie. Počet kopií cDNA kódující *NPM1::ALK* v žádném ze vzorků neklesl pod detekční limit.

Stejně jako v případě Pacienta č. 11 jsem i zde hodnoty získané metodou dPCR, udávající počet kopií/μl cDNA kódující *NPM1::ALK* nebo *ABL1*, upravil vydělením množstvím použité cDNA v ng a následným vynásobením koeficientem 50. Tato úprava byla nezbytná pro sjednocení hodnot na referenční množství 50 ng cDNA, vzhledem k tomu, že některé vzorky nedosahovaly optimální koncentrace umožňující použití uvedeného množství v daném protokolu.

Veškerá data uvedená v tabulce (Tabulka 14), která je součástí přílohy této diplomové práce, jsem následně graficky zpracoval (Graf 9) a porovnal je s klinickým průběhem onemocnění pacienta s cílem posoudit míru korelace mezi počtem kopií cDNA kódující *NPM1::ALK* a jeho aktuálním klinickým stavem.

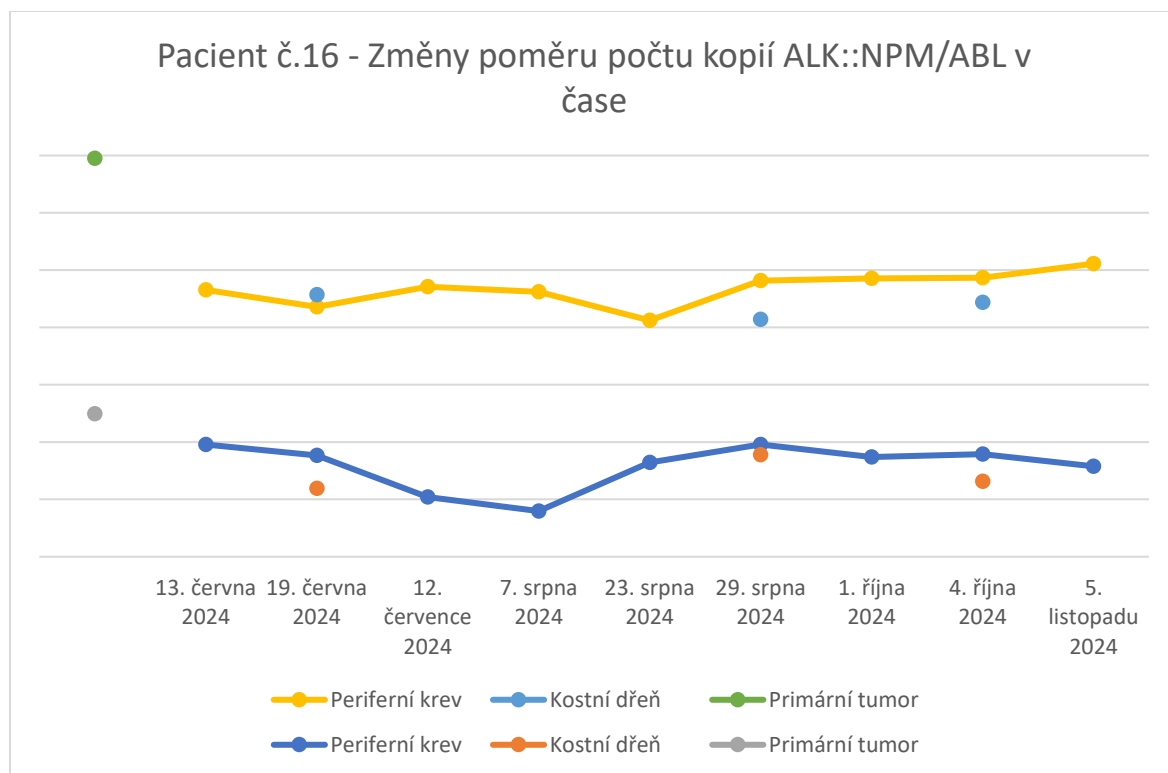


Graf 9 Změny počtu kopií fúzního genu *NPM1::ALK*, vztažených ke kontrolnímu genu *ABL1* u pacienta s *ALK+ ALCL* (Pacient č.16)

Pacient č. 16 byl diagnostikován s refrakterním *ALK+ ALCL* dne 28. května 2024 a následně zahájil léčbu dle standardizovaného protokolu *ALCL99*. Tento protokol zahrnuje intenzivní chemoterapeutický režim využívaný primárně u dětských a adolescentních pacientů, jehož cílem je dosažení kompletní remise. Navzdory zahájené léčbě však u pacienta došlo již po dvou měsících k progresi onemocnění, což poukazuje na refrakterní charakter choroby, tedy rezistenci na zavedenou standardní chemoterapii.

Vzhledem k absenci uspokojivé léčebné odpovědi byla dne 22. října 2024 indikována cílená terapie s využitím *ALK* inhibitoru Brigatinibu. Od jejího nasazení jsem zaznamenal mírný pokles hladiny exprese fúzního transkriptu *NPM1::ALK*, což korelovalo se zlepšením klinického stavu pacienta. Ke dni klinické kontroly 23. ledna 2025 pacient žije s aktivním onemocněním (=alive with disease, AD) a stále pokračuje v cílené terapii, přičemž dle lékařského záznamu došlo k výraznému zlepšení jeho celkového klinického stavu. Další vývoj léčby bude záviset na dlouhodobé účinnosti cílené terapie a případném rozhodnutí o zavedení dalších terapeutických intervencí.

V následujícím grafu (Graf 10) jsem porovnal dynamiku poměru kopií $NPM1::ALK/ABL1$ v čase, tedy analýzu s využitím normalizačního genu, a vývoj absolutního počtu kopií $NPM1::ALK$ v čase bez využití normalizačního genu. Na rozdíl od Pacienta č. 11 zde byly patrné výrazné rozdíly ve vývoji obou grafů, kdy pokles hodnot v jednom z grafů často korespondoval s jejich vzestupem v grafu druhém, a naopak.



Graf 10 Porovnání změny v podobě grafů u měření MRN v čase při použití referenčního genu (spodní graf, jehož prvky jsou označeny tmavě modře, oranžově a šedě) a bez použití referenčního genu (horní graf, jehož prvky jsou označeny žlutě, světle modře a zeleně) (Pacient č.16)

Na rozdíl od Pacienta č. 11 jsem v tomto případě nepozoroval korelaci mezi hladinou minimální reziduální nemoci (MRN) a klinickým stavem pacienta u obou přístupů, ale pouze u přístupu, který vztahuje získaná data k expresi referenčního genu (Graf 10). Dne 7. srpna 2024 byla zřejmá korelace mezi progresí onemocnění, která se projevila zhoršením klinického stavu pacienta, a současným zvýšením hodnoty udávající poměr počtu kopií $NPM1::ALK/ABL1$. Zároveň jsem zaznamenal korelaci mezi zlepšením klinického stavu po zahájení podávání přípravku Brigatinib dne 22. října 2024 a následným poklesem hodnot poměru $NPM1::ALK/ABL1$ mezi 4. říjnem a 5. listopadem 2024.

Oproti tomu při hodnocení pouze absolutního počtu kopií *NPM1::ALK* v čase jsem dne 7. srpna 2024, tedy v období progresu onemocnění, pozoroval pokles těchto hodnot, a naopak po zahájení cílené terapie dne 22. října 2024 jejich zvýšení. Tato data tedy naznačovala vyšší validitu výsledků v případě použití poměrových hodnot normalizovaných na referenční gen s konzistentní expresí oproti samotným hodnotám počtu kopií sledovaného genu bez referenčního rámce.

Dalším argumentem pro zachování normalizace výsledků na kontrolní gen může být analýza vzorků primárního nádoru získaných z FFPE materiálu. V průběhu formolové fixace dochází k degradaci a fragmentaci nukleových kyselin. I přes to, že po izolaci může být naměřena relativně vysoká koncentrace DNA nebo RNA, fragmentace na krátké úseky snižuje efektivitu amplifikace při PCR. Pokud nejsou výsledky kvantitativní PCR vztahovány ke kontrolnímu genu, dochází ke zkreslení výsledků a naměřené hodnoty bývají výrazně nižší. Naopak při normalizaci na referenční gen, který je obdobně ovlivněn procesem fixace, dochází ke korekci těchto odchylek a výsledky jsou následně srovnatelné s daty ze vzorků pocházejících z mražené nebo nativní tkáně.

Na základě získaných dat jsem tedy dospěl k závěru, že sledování MRN v čase může spolehlivě korelovat s vývojem klinického stavu pacientů s *ALK+ ALCL*, avšak pouze v případě, že jsou počty kopií sledované fúze *NPM1::ALK* vztahovány k referenčnímu genu. Při využití absolutních hodnot bez referenčního genu se výsledky MRN nemusí shodovat s klinickým průběhem onemocnění, především z důvodu nezohlednění kvality analyzovaného vzorku.

5.1 Navržení sondy a primerů pro detekci fúzního genu *TPM3::ALK*

Jak již bylo uvedeno, v současnosti probíhá v Laboratoři molekulární patologie ve Fakultní nemocnici v Motole molekulárně genetická diagnostika pacientů s *ALK+ ALCL*, u nichž byla prokázána přítomnost translokace *t(2;5)*, vedoucí ke vzniku fúzního genu *NPM1::ALK*. Primery a sonda navržené k detekci této fúze byly využívány v předchozích experimentech diplomové práce.

Přestože je uvedená translokace nejčastější, bylo nezbytné navrhnout primery a sondu i pro detekci méně častých fúzních genů. V rámci této diplomové práce jsem se zaměřil na fúzi *TPM3::ALK*, která se u *ALK+ ALCL* vyskytuje jako druhá nejčastější. U této fúze

mohou vznikat dva různé zlomové body v genu *TPM3*, konkrétně v exonu 7 nebo v exonu 8. Pro účely této práce jsem navrhl primery specifické pro variantu *TPM3::ALK* se zlomem v exonu 7, jelikož právě tato varianta byla v Laboratoři molekulární patologie ve FN Motol pozorována s vyšší četností. Fúzní variantu *TPM3::ALK* s fúzí exonů 7-20 jsem identifikoval u 4 z 5 dříve diagnostikovaných pacientů s diagnózou ALK+ ALCL s průkazem fúzního genu *TPM3::ALK*.

Pro návrh primerů a sondy jsem využil vzorek cDNA pacienta s ALK+ ALCL, u něhož byla potvrzena translokace t(1;2) vedoucí ke vzniku fúzního genu *TPM3::ALK*. Jednalo se o vzorek odebraný z primárního tumoru v době diagnózy. K získání požadované sekvence jsem využil metodu Sangerova sekvenování.

Níže jsou uvedeny sekvence získané metodou Sangerova sekvenování ze vzorku pacienta s ALK+ ALCL a fúzí *TPM3::ALK*. Sekvenci získanou pomocí primeru Primer ALK3455R jsem následně převedl na její komplementární reverzní sekvenci, abych ji mohl porovnat a spojit se sekvencí získanou pomocí primeru Primer TPM3/249F. Tento krok umožnil eliminaci chybných bází na 5' konci způsobených nekvalitním sekvenováním a sestavení kompletní cílové sekvence.

Primer TPM3/249F 5'to 3':

```
CGAWWWWMCCTTAAATTGCAWRARAGAWCGGWAGCCRGCTGRAWAGACAATTGATGACCTGGA  
AGTGTACCGCCGGAAGCACCAGGAGCTGCAAGCCATGCAGATGGARCTGCAGAGCCCTGAGT  
ACAAGCTRAGCAAGCTCCGCACCTCGACCATCATGACCGACTACAACCCCAACTACTGCTTT  
GCTGGCAAGACCTA
```

Primer ALK3455R 5'to 3':

```
CAWYYYGGAWMCYCKTTMTGATGAKYCGTGSTGCGGAGCTTGCTCAGCTATGTACTCAGGR  
CTCTGCAGCTCMATCTGCATGGCWTGCAGCTCCTGGTGCTTCCGGCGGTACACTTCCAGGTC  
ATCAATTGTCTTTTCCAGCTTGGCTACCGATCTCTCAGCAAACTCAGCACGGGTCTCTGCCT  
CCTTGGGTTTATCAGT
```

Komplementární sekvence k Primer ALK3455R 3'to 5':

```
TACTGATAAAACCCAAGGAGGCAGAGACCCGTGCTGAGTTTGCTGAGAGATCGGTAGCCAAG  
CTGGAAGAGACAATTGATGACCTGGAAGTGTACCGCCGGAAGCACCAGGAGCTGCAWGCCAT  
GCAGATKGAGCTGCAGAGYCCTGAGTACATAGCTGAGCAAGCTCCGCASCACGRMTCATCAK  
AAMGGRGKWTCCRRRWTG
```

Sekvenci získanou za pomoci primeru Primer ALK3455R jsem následně analyzoval s využitím nástroje BLAST® porovnáním s referenčními sekvencemi cDNA odvozenými z mRNA pro geny *ALK* (NCBI referenční sekvence: NM_004304.5) a *TPM3* (NCBI referenční sekvence: NM_152263.4), s cílem identifikovat přesné místo zlomu a translokace v obou genech. Na základě této analýzy byl jako místo zlomu určen guanosin (G) nacházející se na pozici 115 v sekvenci získané pomocí primeru Primer ALK3455R.

Následně jsem uvedenou sekvenci porovnal také se sekvencí cDNA pro *TPM4* (NCBI referenční sekvence: NM_003290.3), který může rovněž fúzovat s genem *ALK* a vykazuje částečnou sekvenční homologii s genem *TPM3*.

Porovnání sledované sekvence se sekvencí pro *ALK* (NCBI referenční sekvence: NM_004304.5):

RT16.1_ALK3455 R sequence exported from chromatogram file

```
Query 4099 GTGTACCGCCGGAAGCACCAGGAGCTGCAAGCCATGCAGATGGAGCTGCAGAGCCCTGAG
4158
Sbjct 115 GTGTACCGCCGGAAGCACCAGGAGCTGCAWGCCATGCAGATKGAGCTGCAGAGYCCTGAG
56
Query 4159 TACA-AGCTGAGCAAGCTCCGCA 4180
Sbjct 55 TACATAGCTGAGCAAGCTCCGCA 33
```

Porovnání sledované sekvence se sekvencí pro *TPM3* (NCBI referenční sekvence: NM_152263.4):

RT16.1_ALK3455 R sequence exported from chromatogram file

```
Query 770 ACTGATAAACTCAAGGAGGCAGAGACCCGTGCTGAGTTTGCTGAGAGATCGGTAGCCAAG
829
Sbjct 202 ACTGATAAACCCAAGGAGGCAGAGACCCGTGCTGAGTTTGCTGAGAGATCGGTAGCCAAG
143
Query 830 CTGGAAGACAATTGATGACCTGGAAG 857
Sbjct 142 CTGGAAGACAATTGATGACCTGGAAG 115
```

Porovnání sledované sekvence se sekvencí pro *TPM4* (NCBI referenční sekvence: NM_003290.3):

RT16.1_ALK3455 R sequence exported from chromatogram file

```
Query 649 CTGACAACTGAAAGAGGCTGAGACCCGTGCTGAATTTGCAGAGAGAACGGTTGCAAAAC
708
Sbjct 201 CTGATAAACCCAAGGAGGCAGAGACCCGTGCTGAGTTTGCTGAGAGATCGGTAGCCAAGC
142
```

```

Query 709 TGGAAAAGACAATTGATGACCTGGAAG 735
          |||||
Sbjct 141 TGGAAAAGACAATTGATGACCTGGAAG 115

```

Následuje sekvence, která byla použita pro navržení primerů a sondy určených k diagnostickým a prognostickým vyšetřením u pacientů s ALK+ ALCL s translokací vedoucí ke vzniku fúzního genu *TPM3::ALK*. Část sekvence označená červeným písmem reprezentuje úsek, který pochází z genu *TPM3*, modrý úsek pochází z genu *ALK* a černé G je společné pro oba geny. Do částí sekvence, které jsou zvýrazněné zeleně, byly navrženy primery, a do žlutě zvýrazněné sekvence byla navržena sonda. Sonda byla navržena tak, aby se nacházela pouze v oblasti pocházející z genu *ALK*, což bylo zvoleno záměrně, aby byl tento diagnostický systém použitelný i pro jiné fúzní geny než uvedený *TPM3::ALK*.

V případě výskytu takové změny by mělo být možné navrhnout pouze primer pro gen, který fúzuje s genem *ALK*, a použít tuto sondu společně s primerem, který se nachází v genu *ALK*. Jedinou podmínkou je zvolit vhodnou oblast v daném genu, která bude ve vhodné vzdálenosti pro vznik produktu a zároveň bude mít teplotu tání (T_m) odpovídající teplotě tání sondy a primeru v genu *ALK*. Pro výběr vhodných primerů s podobnou T_m jsem využil nástroj Primer-BLAST.

Sekvence *TPM3::ALK*:

TACTGATAAAACCCAAGGAGGCAGAGACCCGTGCTGAGTTTGCTGAGA GATCGGTAGCCAAG
CTGGAA AAGACAATTGATGACCTGGAAG TGTACCGCCGGAAGCACCAGGAGCTGCAAGCCAT
GCAGATGGARCTGCAGAGCCCTGAGTACAAGCTRAGCAAGCTCCGCA CCGACCATCATGA
CCGACTACAACCCCAACTACTGCTTTGCTGGCAAGACCTA

Výsledná podoba navržené sondy a primerů, včetně koncentrace použité při testování:

Tabulka 10 Mnou navržené primery pro fúzní mutaci *TPM3::ALK*

Označení primeru či sondy	Koncentrace	Teplota tání (T_m)	Sekvence (5'-3')
Primer ALK	10pM/ul	57,6 °C	GTC GGT CAT GAT GGT CGA GG
Primer TPM3	10pM/ul	57,1 °C	GAT CGG TAG CCA AGC TGG AA
TPM3::ALK sonda	4pM/ul	62,6 °C	/56-FAM/GTG TAC CGC /ZEN/ CGG AAG CAC CA/3IABkFQ/

Tyto primery a sonda byly testovány za pomoci dPCR na dvou vzorcích cDNA pacientů s fúzním genem *TPM3::ALK*, které byly použity k navržení sondy a primerů.

Pro ověření univerzálnosti primeru *ALK* a sondy *TPM3::ALK* jsem použil patientský vzorek cDNA pocházející z primárního tumoru, u kterého již byla zjištěna pozitivita při testování na výskyt mutace *NPM1::ALK* při porovnávání dPCR a qPCR. Jednalo se o vzorek č. 15 pacienta č. 3. Primer *TPM3* byl v tomto případě nahrazen primerem *NPM/ALK R*, který se využívá k diagnostice pacientů s fúzním genem *NPM1::ALK*.

Kromě těchto primerů a sondy jsem použil také primery a sondu pro sledování exprese genu *ABL1*, který sloužil jako pozitivní kontrola. Při testování jsem využil multiplexní protokol *ALK::NPM*, *ABL1*, který byl použit k testování exprese *NPM1::ALK* při porovnávání dPCR a qPCR.

Tabulka 11 Výsledky dPCR při testování nových primerů a sondy sledující fúzní mutaci *TPM3::ALK*:

ID vzorku	FAM (Koncentrace [kopie/μl], konečný výsledek)	HEX (Koncentrace [kopie/μl], konečný výsledek)
Pac. č. 1 (TPM3::ALK) vz. 1	2417,6585, Positive	12361,8816, Positive
Pac. č. 2 (TPM3::ALK) vz. 2	202,7989, Positive	578,1542, Positive
Pac. č. 3 (NPM1::ALK) vz. 15	47764,5515, Positive	2793,8495, Positive
NTC	N/A, Negative	N/A, Negative

Po provedení dPCR všechny vzorky vykázaly pozitivní výsledek na expresi sledovaného genu, což potvrzuje použitelnost této sondy jak pro sledování exprese *TPM3::ALK*, tak pro další fúzní mutace genu *ALK*, pokud bude vytvořen primer nasedající na fúzního partnera genu *ALK*.

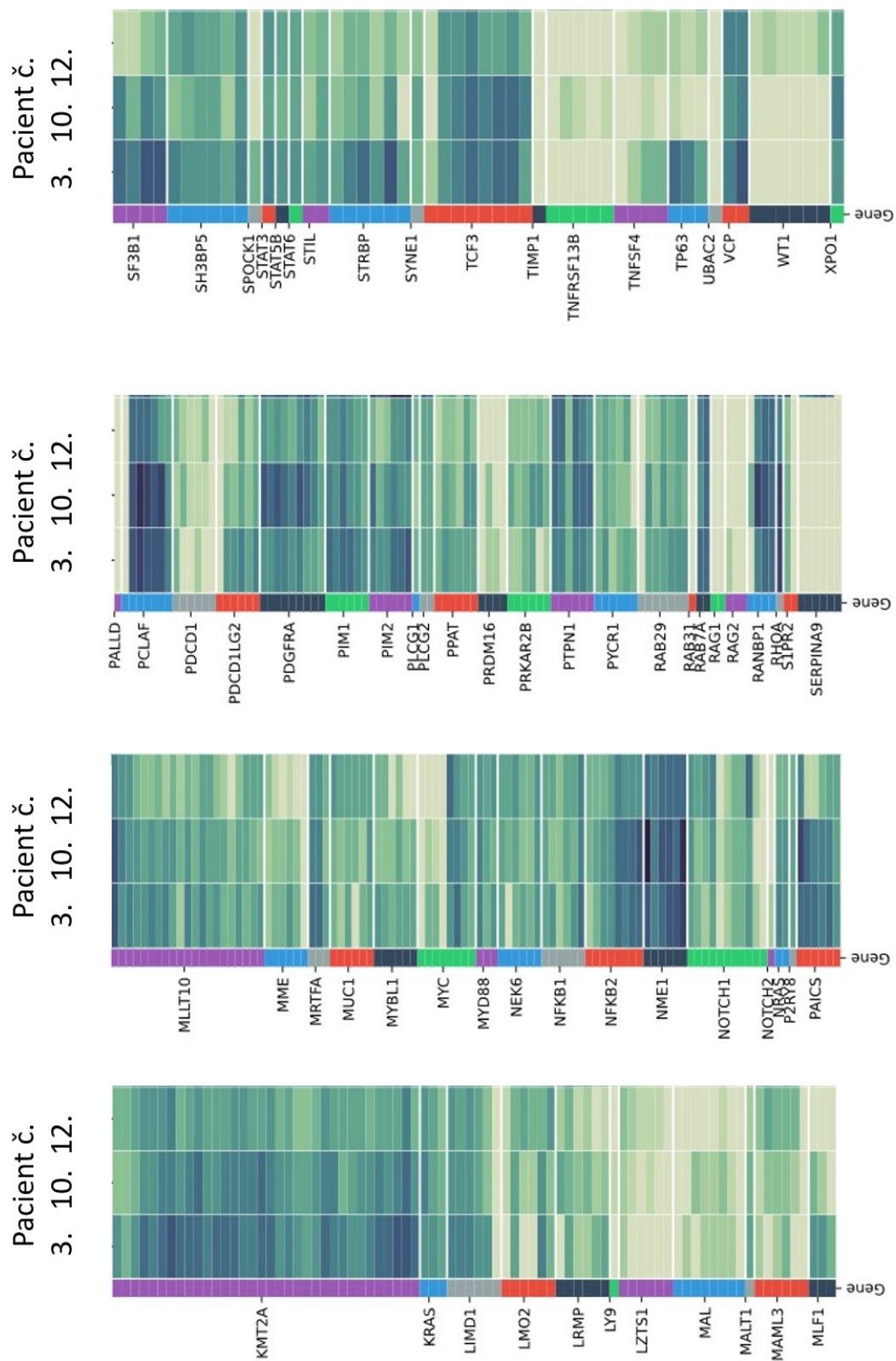
Dále jsem s výše uvedenou sadou primerů a sondy testoval jeden vzorek cDNA od pacienta s fúzní mutací *TPM4::ALK*, abych ověřil, zda vzhledem k částečné homologii mezi geny *TPM3* a *TPM4* bude tato fúzní mutace také pozitivní. Jedná se o vzorek, který je v Laboratoři molekulární patologie ve Fakultní nemocnici v Motole používán jako pozitivní kontrola pro mutaci *TPM4::ALK*. Tento vzorek, na rozdíl od předchozích, nevyšel pozitivně, což potvrzuje, že použití těchto primerů a sondy je vhodné při diagnostice pacientů s *TPM3::ALK*, přičemž nehrozí falešné zařazení pacienta s fúzní mutací *TPM4::ALK* do této skupiny, díky částečné homologii mezi těmito geny.

5.2 Sledování korelace mezi změnou exprese genu *ALK* a dalších genů u pacientů s *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*

V rámci této části diplomové práce jsem za použití dat získaných za pomoci NGS porovnával změny v expresi genů u pacientů s ALK+ ALCL s prokázanými fúzními geny *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK*, anebo *TPM4::ALK*.

5.2.1 Porovnání exprese genů u pacientů s fúzním genem *NPM1::ALK*

Nejprve jsem zkoumal případnou variabilitu v expresi genů u pacientů s fúzním genem *NPM1::ALK*. Na rozdíl od *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK* byla kohorta vzorků s touto fúzí zkoumána samostatně, což bylo dáno tím, že se jedná o nejčastější mutaci, která se u pacientů s ALK+ ALCL vyskytuje, a zároveň o hlavní typ fúzního genu, na který je tato odborná práce zaměřena. K analýze jsem použil 3 vzorky cDNA od 3 různých pacientů, kteří byli při přípravě vzorků označeni jako Pacient č. 3, 10 a 12. Jako NGS panel pro sledování exprese genů u těchto pacientů byl použit Archer FusionPlex Lymphoma panel, který umožňuje detekci fúzních genů, přestaveb a změn v genové expresi relevantních pro hematologické malignity. V případě pacientů s fúzí *NPM1::ALK* byl tento přístup využit ke kvantitativní analýze genové exprese, přičemž hlavní důraz byl kladen na rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Cílem této části analýzy bylo identifikovat případnou variabilitu v expresi genů zapojených do signálních drah souvisejících s onkogenezí, která by mohla souviset s biologickou heterogenitou tohoto podtypu ALK+ ALCL.

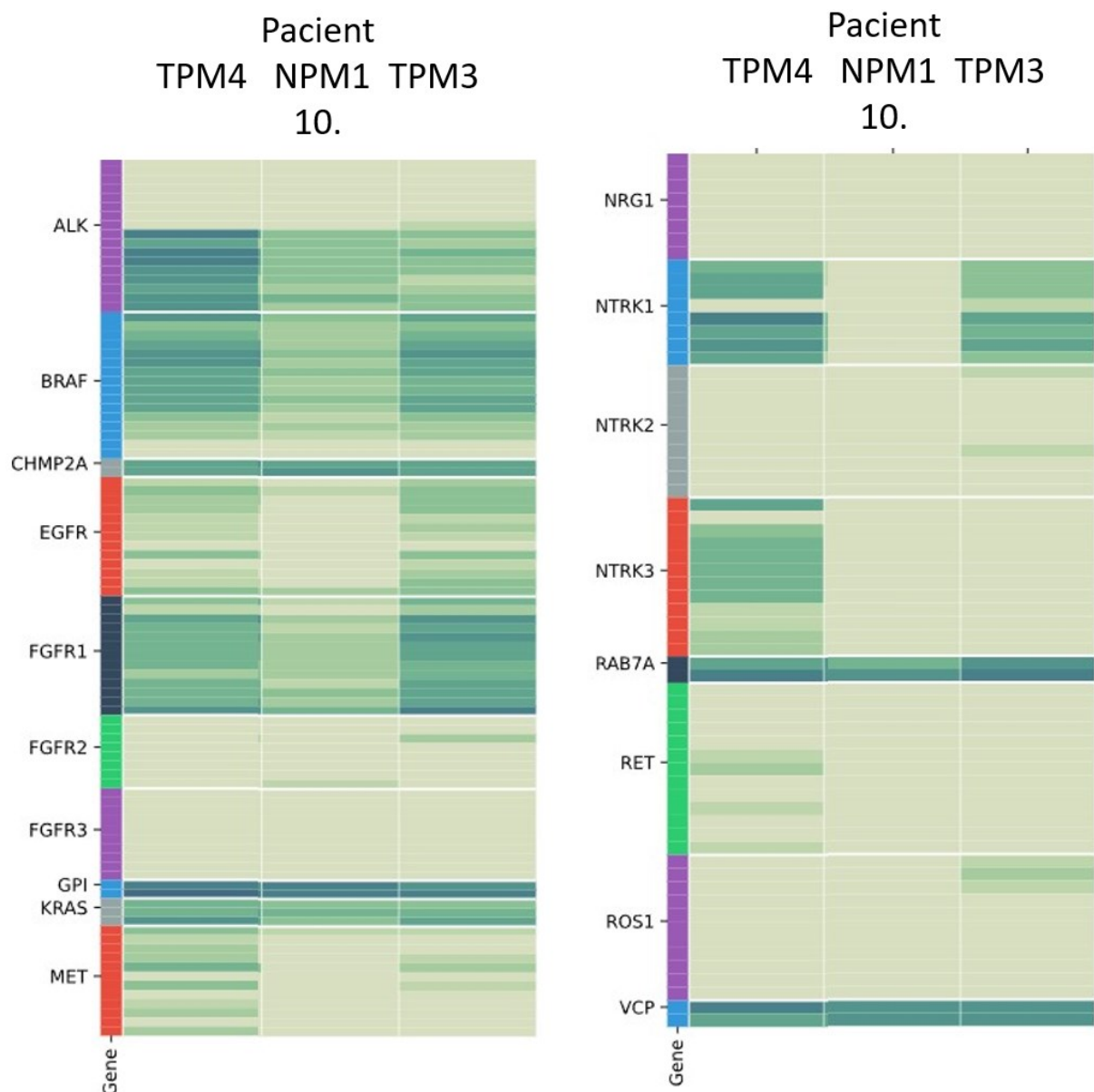


Obrázek 15 Porovnání heatmap pacientů s fúzní mutací *NPM1::ALK* (2. část)

V případě porovnání exprese genů u pacientů, u kterých došlo k translokaci vedoucí ke vzniku fúzního genu *NPM1::ALK*, bylo u všech pacientů zjištěno, že došlo k expresi pouze části genu *ALK*, což svědčí o jeho translokaci, kdy následně dochází k transkripci pouze translokované 3' části tohoto genu. Co se týče dalších sledovaných genů, nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl v jejich expresi mezi jednotlivými pacienty, přičemž odchylky v míře exprese genů mezi pacienty mohou být odůvodněny rozdílnou kvalitou materiálu. V porovnání s pacienty č. 3 a 10, u pacienta č. 12 došlo k mírně odlišné expresi genů. U tohoto pacienta bylo na rozdíl od ostatních pacientů zjištěno vyjádření genu *WT1* (Gen Wilmsova tumoru 1), zatímco nedocházelo k expresi genů *MLF1* (Faktor 1 myeloidní leukemie) a *PRDM16* (Protein obsahující PR-doménu 16). Tento výsledek naznačuje existenci variability v expresních profilech u jednotlivých případech tohoto onemocnění.

5.2.2 Porovnání expresních profilů u pacientů s fúzními geny *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*.

V rámci této části odborné práce jsem porovnával změny v expresi genů u tří pacientů s ALK+ ALCL, u kterých se vyskytovaly fúzní geny *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK* nebo *TPM4::ALK*. Pro sledování exprese genů u těchto pacientů byl použit NGS panel Archer FusionPlex Lung V1, který je běžně využíván při diagnostice fúzních genů u pacientů s plicními nádory, především k detekci známých i nových genových fúzí zahrnujících *ALK*, *ROS1* a *RET*. V tomto případě však byl panel využit pro účely výzkumu a zhodnocení transkripční aktivity vybraných genů u pacientů s ALK+ ALCL, což bylo primárně zvoleno z finančních důvodů. I když panel není určen pro hematologické malignity, jeho konstrukce umožňuje detekci řady fúzí, včetně těch zahrnujících gen *ALK*, čímž poskytuje přehled o aktivaci fúzních transkriptů a doprovodných změnách v expresi dalších genů. Analýza exprese jednotlivých fúzních partnerů genu *ALK*, tedy v tomto případě *NPM1*, *TPM3* a *TPM4*, tak může přinést cenné informace o rozdílných expresních vzorcích a potenciálních biologických odlišnostech mezi jednotlivými variantami fúzí, které mohou mít významný dopad na patogenezi onemocnění i na potenciální odpověď na cílenou terapii.



Obrázek 16 Porovnání heatmap pacientů s fúzními geny *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*

Při porovnání dat u těchto tří pacientů, stejně jako v případě porovnání tří pacientů s fúzním genem *NPM1::ALK* bylo zřejmé, že dochází k expresi pouze části genu *ALK*, což naznačuje fúzi v exonu 20. Stejně jako při porovnání expresních profilů mezi jednotlivými geny u tří pacientů s fúzí *NPM1::ALK*, i zde bylo možné přičíst rozdíly v exprese genů rozdílné kvalitě použitého materiálu. Hlavním rozdílem byly geny z rodiny *NTRK* (Geny pro neurotrofinní receptorové tyrosinkinázy), přičemž v případě *NTRK1* nedocházelo k expresi u pacientů s fúzním genem *NPM1::ALK*, ale u pacientů s *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK* ano. Toto naznačuje možnou specifickou aktivaci transkripce tohoto genu v kontextu odlišného fúzního partnera *ALK*. V případě exprese genu *NTRK3* docházelo k expresi pouze u pacientů

s fúzním genem *TPM4::ALK*, nikoliv u pacientů s fúzními geny *NPM1::ALK* a *TPM3::ALK*. Z toho je možné usoudit, že exprese tohoto genu může být specificky indukována pouze některými typy fúzních variant, případně může souviset s unikátními biologickými vlastnostmi daného nádoru či kontextem aktivace specifických signálních drah.

6 Diskuse

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zavedení nové metody dPCR, která byla následně porovnávána s dosud rutinně používanou metodou qPCR v Laboratoři molekulární patologie ve Fakultní nemocnici v Motole. Při využití každé z těchto metod byla exprese *ALK* monitorována prostřednictvím odlišné analytické strategie. V případě qPCR byla hodnocena exprese 3' konce genu *ALK*, což představuje výhodu univerzální detekce napříč různými fúzními partnery tohoto genu. Naproti tomu v případě dPCR byla cílem analýzy specifická detekce fúzního transkriptu *NPM1::ALK*. Tato změna byla realizována v kontextu snahy o implementaci standardizovaného mezinárodního protokolu zaměřeného na detekci nejčastějšího fúzního transkriptu *NPM1::ALK*.

Při testování 112 vzorků cDNA vyšlo 29 pozitivně při použití obou PCR metod, 8 vzorků vyšlo pozitivně pouze při použití dPCR a 3 byly pozitivní pouze v případě qPCR.

U osmi vzorků, které byly pozitivní výhradně při použití dPCR, je pravděpodobnou příčinou jejich detekce vyšší analytická citlivost této metody, což odpovídá i naměřeným nízkým absolutním hodnotám, pohybujícím se v rozmezí 0,58 až 47,03 kopií/μl.

Naopak tři případy, v nichž byly vzorky cDNA pozitivní pouze při použití qPCR a negativní při dPCR, představují méně jednoznačný výsledek. Jedním z možných vysvětlení těchto rozdílů je nutnost ředění cDNA v rámci dPCR, která je nezbytná pro optimalizaci celkového množství templátu v reakční směsi. Tento fakt by podporovaly relativně nízké hodnoty počtu kopií transkriptu genu *ALK*, pohybujících se v rozmezí $3,98 \times 10^{-6}$ až $9,81 \times 10^{-3}$ kopií/μl po normalizaci.

Pro ověření rozdílu v analytické citlivosti obou metod byl vybrán patientský vzorek, který byl naředěn na koncentraci 20 ng/μl, což odpovídá optimálním 50 ng v objemu 2,5 μl použitým pro jednu reakci v metodě dPCR. Tento vzorek byl následně dekadicky ředěn až do koncentrace odpovídající 10^{-6} původního vzorku. Na základě analýzy výsledků bylo potvrzeno, že metoda dPCR vykazuje vyšší citlivost než qPCR, neboť pozitivita vzorku byla detekována až do ředění 10^{-4} , zatímco v případě qPCR byla pozitivita detekována pouze do ředění 10^{-3} .

Součástí práce bylo rovněž srovnání diagnostické výpovědní hodnoty vzorků kostní dřeně a periferní krve u pacientů s ALK+ ALCL. Odběr periferní krve představuje méně invazivní přístup, vhodný zejména pro opakované sledování pacientů, avšak bývá často

limitován nižším množstvím cirkulujících nádorových buněk. Naproti tomu vzorky kostní dřeně mohou být ovlivněny fokálním výskytem nádorových buněk, který je typický pro solidní nádory, kam spadá také ALK+ ALCL. Tento jev může vést k falešně negativním výsledkům v případě odběru z oblasti bez přítomnosti nádorové infiltrace.

Pro účely testování bylo analyzováno celkem 16 párových vzorků periferní krve a kostní dřeně odebraných ve stejný den, čímž se eliminoval vliv potenciální variability MRN v čase. Z tohoto souboru vykázalo 9 párů negativitu u obou typů vzorků, ve 4 případech byla detekována pozitivita současně v obou typech materiálu a ve 3 případech byla pozitivita zjištěna pouze ve vzorcích kostní dřeně. Ačkoli tato data indikují vyšší výtěžnost analýzy kostní dřeně, vzhledem k malému počtu pozitivních vzorků nelze z těchto výsledků vyvozovat zobecňující závěry. Omezený počet vhodných vzorků byl dán nízkou incidencí onemocnění ALK⁺ ALCL, která limitovala dostupnost dostatečně velkého a reprezentativního souboru. Další komplikací byla nízká koncentrace cDNA u dvou vzorků periferní krve, což mohlo vést k falešně negativnímu výsledku.

V další části této práce byla zkoumána korelace mezi změnami v MRN, sledovanými metodou dPCR, a klinickým stavem pacientů. V rámci tohoto experimentu byly analyzovány vzorky cDNA pocházející od dvou pacientů diagnostikovaných s ALK+ ALCL. Jednalo se o sériové vzorky odebírané v průběhu léčby a také po jejím ukončení s cílem monitorovat případný relaps onemocnění. Získané laboratorní výsledky byly následně porovnány s příslušnou zdravotnickou dokumentací těchto pacientů. V obou případech byla potvrzena korelace mezi dynamikou MRN a aktuálním klinickým stavem, kdy v období zlepšení klinického stavu docházelo k poklesu počtu kopií cDNA specifické pro fúzní transkript *NPM1::ALK*, normalizované vůči expresi referenčního genu *ABL1*, zatímco při zhoršení klinického stavu byl zaznamenán jejich nárůst.

Současně byla testována hypotéza formulovaná členem laboratoře, zda je možné dosáhnout srovnatelné korelace mezi MRN a klinickým stavem pacientů i bez použití referenčního genu, tedy pouze na základě absolutního počtu kopií transkriptu *NPM1::ALK*. Tato hypotéza však byla při vyhodnocení výsledků vyvrácena, neboť v takto zjednodušeném modelu již nebyla korelace mezi změnami MRN a klinickým stavem pacientů pozorována.

Dalším experimentem realizovaným v rámci této odborné práce bylo porovnání transkripčních profilů získaných pomocí metody NGS u pacientů s ALK+ ALCL, u nichž byla detekována fúze *NPM1::ALK*. Kromě toho byly vzájemně porovnávány i transkripční

profily pacientů s odlišnými typy fúzí, konkrétně *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*. V případě porovnání 3 pacientů s fúzí *NPM1::ALK* byly expresní profily dvou z nich téměř totožné a rozdíl nastal až u posledního pacienta, kde na rozdíl od předchozích dvou pozorována exprese genu *WT1*, a naopak zde nebyla pozorována exprese genů *MLF1* a *PRDM16*, což vypovídá o odlišném transkripčním profilu tohoto pacienta, který může být důsledkem specifických molekulárních charakteristik nádoru, případně přítomnosti dalších genetických nebo epigenetických změn. Exprese genu *WT1* u tohoto pacienta může, stejně jako při jeho výskytu u jiných typů hematologických malignit, naznačovat aktivaci specifických drah spojených s proliferací nebo diferenciací buněk (Goel et al., 2020). Naopak absence exprese genů *MLF1* a *PRDM16* může reflektovat utlumení regulačních mechanismů spojených s hematopoézou nebo metabolickou rovnováhou, což by mohlo mít vliv na chování nádoru či odpověď na terapii (Casamassimi et al., 2020; Li, Yang, et al., 2023). Tyto odlišnosti dále poukazují na možnou heterogenitu mezi jednotlivými případy a zdůrazňují potřebu individuálního přístupu při interpretaci molekulárních dat a plánování následné léčby.

V případě porovnávání expresních profilů mezi 3 pacienty s fúzními geny *NPM1::ALK*, *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK* byla pozorována rozdílná exprese u 2 členů *NTRK* rodiny. V případě genu *NTRK1* docházelo k expresi pouze u pacientů s *TPM3::ALK* a *TPM4::ALK*, ale ne u pacienta s *NPM1::ALK*. V případě *NTRK3* byla exprese pozorována pouze u pacienta s *TPM4::ALK*. Toto opět vypovídá o variabilitě v expresi genů u pacientů s ALK+ ALCL u nichž došlo k rozdílným fúzím zahrnujících gen *ALK*.

Závažným omezením těchto výsledků je však velmi nízký počet analyzovaných vzorků. Je tedy pravděpodobné, že jiné, méně frekventované expresní vzorce zůstaly v tomto souboru nepozorovány. Pro potvrzení těchto výsledků a získání reprezentativnějších dat by bylo vhodné daný experiment zopakovat na větším souboru patientských vzorků, pokud by byly k dispozici.

Kromě předchozích experimentů se rovněž v rámci odborné práce podařilo navrhnout a ověřit sondu pro fúzní transkript *TPM3::ALK*. Tato sonda je navržena tak, aby byla univerzálně použitelná, přičemž při použití specifických primerů pro jednotlivé fúzní transkripty může být metoda snadno adaptována na detekci různých fúzních genů v rámci ALCL. Tímto způsobem se práce přibližuje konceptu multiplexního a flexibilního diagnostického přístupu, který by mohl být v budoucnu součástí rutinní diagnostiky.

7 Přílohy

Tabulka 12 Souhrn výsledků všech vzorků testovaných při porovnávání qPCR a dPCR, NH=nehodnotitelné

Číslo vzorku	Označení pacienta	Typ vzorku	Koncentrace (ng/ul)	qPCR	dPCR
				Poměr počtu kopií <i>ALK</i> / <i>B2M</i>	Poměr počtu kopií <i>NPM1::ALK</i> / <i>ABL1</i>
1	Pacient č.1	prim. T	7,08	0,769819324	1,036978111
2	Pacient č.1	KD	8	0	0
3	Pacient č.1	KD	11,6	0	0
4	Pacient č.1	perif. krev	32,8	0	0,000559797
5	Pacient č.1	perif. krev	55,8	0	0
6	Pacient č.1	perif. krev	22,6	0	0
7	Pacient č.1	perif. krev	71,4	0	0
8	Pacient č.2	prim. T	61,2	0,224194292	1,983752830
9	Pacient č.2	KD	15,7	0	0
10	Pacient č.2	perif. krev	9,56	0	0
11	Pacient č.2	KD	29,4	0,009806296	0
12	Pacient č.2	perif. krev	8,68	0	0
13	Pacient č.2	KD	96,2	0	0
14	Pacient č.2	KD	102	0	0
15	Pacient č.3	prim. T	6,4	2,758919799	0,569375980
16	Pacient č.3	KD	4,22	0	0
17	Pacient č.3	perif. krev	2,88	0	0
18	Pacient č.3	perif. krev	3,92	0	0
19	Pacient č.3	perif. krev	16,1	0	0
20	Pacient č.3	KD	41,6	NH	NH
21	Pacient č.3	perif. krev	2,72	0	0
22	Pacient č.4	prim. T	41,8	NH	NH
23	Pacient č.4	perif. krev	1,25	NH	NH
24	Pacient č.4	perif. krev	5,24	0	0
25	Pacient č.4	perif. krev	13,7	0	0
26	Pacient č.4	perif. krev	5,46	0	0

27	Pacient č.4	perif. krev	13,7	0	0
28	Pacient č.4	KD	37,6	0	0
29	Pacient č.5	KD	33,8	0	0
30	Pacient č.5	KD	32	0	0,001038314
31	Pacient č.5	perif. krev	32,8	0	0
32	Pacient č.5	perif. krev	31	0	0
33	Pacient č.5	perif. krev	19,5	0	0
34	Pacient č.5	perif. krev	14,3	0	0
35	Pacient č.5	perif. krev	5,46	0	0
36	Pacient č.6	KD	59,4	0	0
37	Pacient č.6	KD	84,4	0	0
38	Pacient č.6	perif. krev	37,2	0	0
39	Pacient č.6	perif. krev	55	0	0
40	Pacient č.6	KD	71,8	0	0
41	Pacient č.6	prim. T	21	0,297343832	0,899885318
42	Pacient č.6	perif. krev	45,2	0	0
43	Pacient č.7	prim. T	42	0,915954656	3,558411684
44	Pacient č.7	perif. krev	40,8	0	0,001061252
45	Pacient č.7	perif. krev	41,2	NH	NH
46	Pacient č.7	perif. krev	17,5	0,000175017	0,000434769
47	Pacient č.7	perif. krev	36,2	0,000003981	0
48	Pacient č.7	KD	73,4	0	0
49	Pacient č.7	KD	56,8	0	0
50	Pacient č.8	perif. krev	14,4	0	0
51	Pacient č.8	KD	92,6	0	0
52	Pacient č.8	perif. krev	8,02	0	0
53	Pacient č.8	KD	10,4	0	0
54	Pacient č.8	KD	57,6	0	0
55	Pacient č.8	perif. krev	8,96	0	0
56	Pacient č.8	perif. krev	78	0,000304882	0
57	Pacient č.9	perif. krev	10,6	0,000328039	0,015389790
58	Pacient č.9	KD	6,26	0,000409665	0,001113775
59	Pacient č.9	perif. krev	33,4	0	0,000566752
60	Pacient č.9	perif. krev	10,6	0,000743639	0,005361459

61	Pacient č.9	perif. krev	35,6	0,000091682	0,000328555
62	Pacient č.9	perif. krev	3,52	0	0
63	Pacient č.9	perif. krev	8,76	0	0
64	Pacient č.10	perif. krev	5,42	0	0
65	Pacient č.10	perif. krev	28,4	0	0
66	Pacient č.10	perif. krev	42,4	0,007432376	0,035604616
67	Pacient č.10	KD	0,49	0	0
68	Pacient č.10	KD	40,8	0,004635805	0,016290828
69	Pacient č.10	perif. krev	18,2	0	0
70	Pacient č.10	perif. krev	3,78	0	0
71	Pacient č.11	perif. krev	3,26	0,010575695	0,257328326
72	Pacient č.11	perif. krev	6,32	0,060058197	0,190797631
73	Pacient č.11	perif. krev	19	0,000809771	0,010559553
74	Pacient č.11	perif. krev	36,8	0,000035193	0,000467077
75	Pacient č.11	perif. krev	9,08	0	0,000177171
76	Pacient č.11	KD	37	0	0
77	Pacient č.11	perif. krev	8,22	0	0
78	Pacient č.12	perif. krev	4	0	0
79	Pacient č.12	KD	48,2	0	0,000123764
80	Pacient č.12	KD	49	0	0,000236485
81	Pacient č.12	perif. krev	22,2	0	0
82	Pacient č.12	KD	50,2	0	0
83	Pacient č.12	perif. krev	24,4	0	0
84	Pacient č.12	perif. krev	21,6	0	0
85	Pacient č.13	perif. krev	12,2	0	0
86	Pacient č.13	perif. krev	9,48	0	0
87	Pacient č.13	perif. krev	1,71	0	0
88	Pacient č.13	perif. krev	30,8	0	0
89	Pacient č.13	perif. krev	33	0	0
90	Pacient č.13	perif. krev	23,2	0	0
91	Pacient č.13	perif. krev	25,4	0	0
92	Pacient č.14	prim. T	16,5	0,356279954	0,900143001
93	Pacient č.14	KD	106	0,030991529	0,054757628
94	Pacient č.14	KD	110	0,409821281	0,119972239

95	Pacient č.14	KD	92,8	0,108559032	0,116766313
96	Pacient č.14	KD	25,8	0	0,003240840
97	Pacient č.14	KD	41,2	0	0
98	Pacient č.14	KD	48,4	0	0
99	Pacient č.15	prim. T	15,4	0,037042252	0,259265738
100	Pacient č.15	KD	90,6	0	0
101	Pacient č.15	KD	33,6	0	0
102	Pacient č.15	KD	12,9	0,000121225	0,000753277
103	Pacient č.15	perif. krev	2,76	0	0
104	Pacient č.15	KD	81	0	0
105	Pacient č.15	KD	85,2	0	0
106	Pacient č.16	prim. T	16,4	0,470244829	3,109280031
107	Pacient č.16	perif. krev	57	0,023658352	0,582322269
108	Pacient č.16	KD	70,4	0,043933744	0,155727614
109	Pacient č.16	KD	58,6	0,065241078	0,119942956
110	Pacient č.16	perif. krev	13,5	0,000019018	0,109373285
111	Pacient č.16	perif. krev	38,55	0,012379721	0,442427472
112	Pacient č.16	perif. krev	28,8	0,033058016	0,910110950

Tabulka 13 Výsledná data, použitá při sledování korelace mezi změnou MRN a klinickým stavem pacienta (Pacient č. 11)

Datum izolace	Vzorek	Datum izolace	Koncentrace (ng/ul)	NPM1::ALK (kopie/μl)	ABL1 (kopie/μl)	NPM1::ALK (v 50 ng)	ABL1 (v 50 ng)	Poměr NPM1::ALK /ABL1 (v 50 ng)
23. října 2019	Prim. t.	23. října 2019	12,6	27234,41	17453,2	43229,21	27703,5	1,560425
21. října 2019	Per. Krev	21. října 2019	3,26	391,26	1520,47	2400,32	9328	0,257324
23. října 2019	Per. Krev	23. října 2019	6,32	166,2	871,08	525,94	2756,58	0,190793
3. prosince 2019	Per. Krev	3. prosince 2019	19	16,42	1554,99	17,28	1636,83	0,010555
3. ledna 2020	Per. Krev	3. ledna 2020	25,4	14,04	8047,58	14,04	8047,58	0,001744
21.	Per.	21.	9,88	3,74	2860,74	7,58	5790,9	0,001307

ledna 2020	Krev	ledna 2020					7	
11. února 2020	Per. Krev	11. února 2020	1,62	0	421,2	0	5199,92	0
4. března 2020	Per. Krev	4. března 2020	36,8	4,02	8606,72	4,02	8606,72	0,000467
31. března 2020	Per. Krev	31. března 2020	9,66	18,33	3537,59	37,95	7324,2	0,005181
21. dubna 2020	Per. Krev	21. dubna 2020	5,48	2,13	1914,53	7,76	6987,32	0,00111
5. května 2020	Per. Krev	5. května 2020	86,6	0,54	2270,52	0,54	2270,52	0,000235
15. května 2020	Per. Krev	15. května 2020	25	0	1087,17	0	1087,17	0
3. června 2020	Per. Krev	3. června 2020	9,08	1,12	6321,56	2,46	13924,14	0,000177
9. července 2020	Per. Krev	9. července 2020	5,28	0	1272,02	0	4818,23	0
9. července 2020	KD	9. července 2020	37	0	2368,5	0	2368,5	0
13. srpna 2020	Per. Krev	13. srpna 2020	8,22	0	1587,58	0	3862,72	0
13. srpna 2020	KD	13. srpna 2020	67,4	0,54	1491,09	0,54	1491,09	0,000361
18. září 2020	Per. Krev	18. září 2020	50,8	0	5251,24	0	5251,24	0
18. září 2020	KD	18. září 2020	15,5	0	7475,33	0	9645,59	0
27. října 2020	Per. Krev	27. října 2020	19,9	0	8869,72	0	8914,29	0
24. listopadu 2020	Per. Krev	24. listopadu 2020	18,4	0	6839,29	0	7434,01	0
1. prosince 2020	Per. Krev	1. prosince 2020	10,4	0	1666,02	0	3203,89	0
18. března 2022	Per. Krev	18. března 2022	13,7	0	7703,35	0	11245,76	0

13. května 2022	Per. Krev	13. května 2022	5,48	0	813,76	0	2969,91	0
13. ledna 2023	Per. Krev	13. ledna 2023	8,22	0	5197,9	0	12646,95	0
3. května 2023	Per. Krev	3. května 2023	15,4	0	8942,51	0	11613,64	0

Tabulka 14 Výsledná data, použitá při sledování korelace mezi změnou MRN a klinickým stavem pacienta (Pacient č. 16)

Datum izolace	Vzorek	Datum izolace	Koncentrace (ng/ul)	NPM1::ALK (kopie/ul)	ABL1 (kopie/ul)	NPM1::ALK (v 50 ng)	ABL1 (v 50 ng)	Poměr NPM1::ALK /ABL1 (v 50 ng)
13. června 2024	perif. krev	13. června 2024	27	452,04	500,55	452,04	500,55	0,903078
17. června 2024	prim.T	17. června 2024	16,4	72984,41	23473,09	89005,38	28625,71	3,109282
19. června 2024	perif. krev	19. června 2024	57	228,94	393,15	228,94	393,15	0,582314
19. června 2024	KD	19. června 2024	70,4	371,89	2388,08	371,89	2388,08	0,155727
19. června 2024	KD	19. června 2024	58,6	63,92	532,92	63,92	532,92	0,119928
12. července 2024	perif. krev	12. července 2024	13,5	348,67	3187,89	516,55	4722,79	0,109373
7. srpna 2024	perif. krev	7. srpna 2024	39	416,13	6646,73	416,13	6646,73	0,062606
23. srpna 2024	perif. krev	23. srpna 2024	38,5	132,83	300,23	132,83	300,23	0,442406
29. srpna 2024	perif. krev	29. srpna 2024	28,8	652,95	717,44	652,95	717,44	0,910117
29. srpna 2024	KD	29. srpna 2024	45	137,86	228,18	137,86	228,18	0,604173
1. října 2024	perif. krev	1. října 2024	17,9	639,71	1169,05	714,76	1306,2	0,547206
4. října 2024	perif. krev	4. října 2024	24,8	736,87	1198,12	736,87	1198,12	0,615021

4. října 2024	KD	4. října 2024	36,6	273,96	1333,29	273,96	1333,2 9	0,205473
5. listopad u 2024	perif. krev	5. listopad u 2024	16,5	1069,93	2840,94	1296,88	3443,5 7	0,376609

8 Seznam literatury

- Aggarwal, P., & Limaïem, F. (2022). Reed Sternberg Cells. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 113–115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01286-9>
- Ahlmann, M., & Hempel, G. (2016). The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(4), 661–671. <https://doi.org/10.1007/S00280-016-3152-1/FIGURES/2>
- Ambrogio, C., Martinengo, C., Voena, C., Tondat, F., Riera, L., Di Celle, P. F., Inghirami, G., & Chiarle, R. (2009). NPM-ALK oncogenic tyrosine kinase controls T cell identity by transcriptional regulation and epigenetic silencing in lymphoma cells. *Cancer Research*, 69(22), 8611. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2655>
- Amin, H. M., McDonnell, T. J., Ma, Y., Lin, Q., Fujio, Y., Kunisada, K., Leventaki, V., Das, P., Rassidakis, G. Z., Cutler, C., Medeiros, L. J., & Lai, R. (2004). Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G1 cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene* 2004 23:32, 23(32), 5426–5434. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207703>
- Andraos, E., Dignac, J., & Meggetto, F. (2021). NPM-ALK: A Driver of Lymphoma Pathogenesis and a Therapeutic Target. *Cancers*, 13(1), 144. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13010144>
- Archer ® FusionPlex ® Protocol for Illumina ®. (n.d.). Retrieved April 10, 2025, from www.archerdx.com
- Archer FUSIONPlex Lung panel v2 | IDT. (n.d.). Retrieved April 10, 2025, from <https://eu.idtdna.com/pages/products/next-generation-sequencing/archer-ngs-assay-solutions/solid-tumor-research/archer-fusionplex-lung-v2-panel>
- Archer FUSIONPlex Lymphoma panel | IDT. (n.d.). Retrieved April 10, 2025, from <https://eu.idtdna.com/pages/products/next-generation-sequencing/archer-ngs-assay-solutions/blood-cancer-research/archer-fusionplex-lymphoma-panel>
- Aubry, A., Galiacy, S., Ceccato, L., Marchand, C., Tricoire, C., Lopez, F., Bremner, R., Racaud-Sultan, C., Monsarrat, B., Malecaze, F., & Allouche, M. (2015). Peptides

- derived from the dependence receptor ALK are proapoptotic for ALK-positive tumors. *Cell Death & Disease*, 6(5), e1736. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2015.102>
- Bai, R. Y., Ouyang, T., Miething, C., Morris, S. W., Peschel, C., & Duyster, J. (2000). Nucleophosmin–anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood*, 96(13), 4319–4327. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V96.13.4319>
- Bai, R.-Y., Dieter, P., Peschel, C., Morris, S. W., & Duyster, J. (1998). Nucleophosmin–Anaplastic Lymphoma Kinase of Large-Cell Anaplastic Lymphoma Is a Constitutively Active Tyrosine Kinase That Utilizes Phospholipase C- γ To Mediate Its Mitogenicity. *Molecular and Cellular Biology*, 18(12), 6951–6961. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.6951>
- Bargou, R. C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M. Y., Bommert, K., Royer, H. D., Scheidereit, C., & Dörken, B. (1996). High-Level Nuclear NF- κ B and Oct-2 Is a Common Feature of Cultured Hodgkin/Reed-Sternberg Cells. *Blood*, 87(10), 4340–4347. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V87.10.4340.BLOODJOURNAL87104340>
- Barta, S., Gromowsky, M. J., D'angelo, C. R., Lunning, M. A., & Armitage, J. O. (2023). ALK-positive anaplastic large cell lymphoma in adults. *Faculty Reviews*, 12, 21. <https://doi.org/10.12703/R/12-21>
- Beckmann, G., & Bork, P. (1993). An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 18(2), 40–41. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90049-S](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90049-S)
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. (n.d.). Retrieved March 26, 2025, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4337457>
- Borchmann, P., Eichenauer, D. A., & Engert, A. (2012). State of the art in the treatment of Hodgkin lymphoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2012 9:8, 9(8), 450–459. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.91>
- Bossi, R. T., Saccardo, M. B., Ardini, E., Menichincheri, M., Rusconi, L., Magnaghi, P., Orsini, P., Avanzi, N., Borgia, A. L., Nesi, M., Bandiera, T., Fogliatto, G., & Bertrand, J. A. (2010). Crystal structures of anaplastic lymphoma kinase in complex with ATP competitive inhibitors. *Biochemistry*, 49(32), 6813–6825. https://doi.org/10.1021/BI1005514/SUPPL_FILE/BI1005514_SI_001.PDF

- Box, J. K., Paquet, N., Adams, M. N., Boucher, D., Bolderson, E., O'Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2016). Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Molecular Biology*, 17(1), 19. <https://doi.org/10.1186/S12867-016-0073-9>
- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*, 220(2). <https://doi.org/10.1083/JCB.202009045/211695>
- Buchan, S. L., & Al-Shamkhani, A. (2012). Distinct motifs in the intracellular domain of human CD30 differentially activate canonical and alternative transcription factor NF- κ B signaling. *PloS One*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0045244>
- Cao, Z., Gao, Q., Fu, M., Ni, N. A. N., Pei, Y., & Ou, W. Bin. (2019). Anaplastic lymphoma kinase fusions: Roles in cancer and therapeutic perspectives (review). *Oncology Letters*, 17(2), 2020–2030. <https://doi.org/10.3892/OL.2018.9856/HTML>
- Casamassimi, A., Rienzo, M., Di Zazzo, E., Sorrentino, A., Fiore, D., Proto, M. C., Moncharmont, B., Gazzarro, P., Bifulco, M., & Abbondanza, C. (2020). Multifaceted Role of PRDM Proteins in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 2648, 21(7), 2648. <https://doi.org/10.3390/IJMS21072648>
- Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., & Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2008 8:1, 8(1), 11–23. <https://doi.org/10.1038/nrc2291>
- Choi, J., Ceribelli, M., Phelan, J. D., Häupl, B., Huang, D. W., Wright, G., Hsiao, T., Morris, V. M., Ciccarese, F., Wang, B., Corcoran, S. R., Scheich, S., Yu, X., Xu, W., Yang, Y., Zhou, J., Zhang, G., Muppidi, J. R., Inghirami, G., ... Staudt, L. M. (2023). Molecular Mechanism of Action of Glucocorticoids in Lymphoma Therapy. *Blood*, 142(Supplement 1), 2986–2986. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2023-174325>
- Chung, I. H., Lu, P. H., Lin, Y. H., Tsai, M. M., Lin, Y. W., Yeh, C. T., & Lin, K. H. (2017). The long non-coding RNA LINC01013 enhances invasion of human anaplastic large-cell lymphoma. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00382-7>
- Cismasiu, V. B., Denes, S. A., Reiländer, H., Michel, H., & Szedlacsek, S. E. (2004). The MAM (meprin/A5-protein/PTPmu) domain is a homophilic binding site promoting the

- lateral dimerization of receptor-like protein-tyrosine phosphatase mu. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26922–26931. <https://doi.org/10.1074/JBC.M313115200>
- Cocco, L., Martelli, A. M., Gilmour, R. S., Rhee, S. G., & Manzoli, F. A. (2001). Nuclear phospholipase C and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1530(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00169-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00169-4)
- Colleoni, G. W. B., Bridge, J. A., Garicochea, B., Liu, J., Filippa, D. A., & Ladanyi, M. (2000). ATIC-ALK: A novel variant ALK gene fusion in anaplastic large cell lymphoma resulting from the recurrent cryptic chromosomal inversion, inv(2)(p23q35). *The American Journal of Pathology*, 156(3), 781–789. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64945-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64945-0)
- Colombo, E., Marine, J. C., Danovi, D., Falini, B., & Pelicci, P. G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature Cell Biology* 2002 4:7, 4(7), 529–533. <https://doi.org/10.1038/ncb814>
- Coluccia, A. M. L., Perego, S., Cleris, L., Gunby, R. H., Passoni, L., Marchesi, E., Formelli, F., & Gambacorti-Passerini, C. (2004). Bcl-XL down-regulation suppresses the tumorigenic potential of NPM/ALK in vitro and in vivo. *Blood*, 103(7), 2787–2794. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-09-3144>
- Cools, J., Wlodarska, I., Somers, R., Mentens, N., Pedeutour, F., Maes, B., De Wolf-Peeters, C., Pauwels, P., Hagemeijer, A., & Marynen, P. (2002). Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 34(4), 354–362. <https://doi.org/10.1002/GCC.10033>
- Corao, D. A., Biegel, J. A., Coffin, C. M., Barr, F. G., Wainwright, L. M., Ernst, L. M., Choi, J. K., Zhang, P. J., & Pawel, B. R. (2009). ALK expression in rhabdomyosarcomas: correlation with histologic subtype and fusion status. *Pediatric and Developmental Pathology: The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 12(4), 275–283. <https://doi.org/10.2350/08-03-0434.1>
- Coutinho-Camillo, C. M., Lourenço, S. V., Nishimoto, I. N., Kowalski, L. P., & Soares, F. A. (2010). Nucleophosmin, p53, and Ki-67 expression patterns on an oral squamous cell carcinoma tissue microarray. *Human Pathology*, 41(8), 1079–1086. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2009.12.010>

- Damm-Welk, C., Mussolin, L., Zimmermann, M., Pillon, M., Klapper, W., Oschlies, I., D'Amore, E. S. G., Reiter, A., Woessmann, W., & Rosolen, A. (2014). Early assessment of minimal residual disease identifies patients at very high relapse risk in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*, *123*(3), 334–337. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-09-526202>
- Deconinck, E., Lamy, T., Foussard, C., Gaillard, F., Delwail, V., Colombat, P., Casassus, P., Lemevel, A., Brion, A., & Milpied, N. (2000). Autologous stem cell transplantation for anaplastic large-cell lymphomas: results of a prospective trial. *British Journal of Haematology*, *109*(4), 736–742. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2000.02098.X>
- Della Corte, C. M., Viscardi, G., Di Liello, R., Fasano, M., Martinelli, E., Troiani, T., Ciardiello, F., & Morgillo, F. (2018). Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Molecular Cancer*, *17*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12943-018-0776-2/TABLES/1>
- Deng, C., Pan, B., & O'Connor, O. A. (2013). Brentuximab Vedotin. *Clinical Cancer Research*, *19*(1), 22–27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0290/84988/AM/BRENTUXIMAB-VEDOTINUPDATE-OF-BRENTUXIMAB>
- Digital LightCycler® 5x DNA Master. (n.d.). Retrieved March 26, 2025, from <https://rochesequencingstore.com/catalog/digital-lightcycler-5x-dna-master/>
- Donella-Deana, A., Marin, O., Cesaro, L., Gunby, R. H., Ferrarese, A., Coluccia, A. M. L., Tartari, C. J., Mologni, L., Scapozza, L., Gambacorti-Passerini, C., & Pinna, L. A. (2005). Unique substrate specificity of anaplastic lymphoma kinase (ALK): Development of phosphoacceptor peptides for the assay of ALK activity. *Biochemistry*, *44*(23), 8533–8542. <https://doi.org/10.1021/BI0472954/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BI0472954N00001.GIF>
- Ducray, S. P., Natarajan, K., Garland, G. D., Turner, S. D., & Egger, G. (2019). The Transcriptional Roles of ALK Fusion Proteins in Tumorigenesis. *Cancers 2019, Vol. 11, Page 1074*, *11*(8), 1074. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11081074>
- Eichmann, T. O., & Lass, A. (2015). DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol—stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences 2015* *72*:20, *72*(20), 3931–3952. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-1982-3>

- Eirín-López, J. M., Frehlick, L. J., & Ausió, J. (2006). Long-Term Evolution and Functional Diversification in the Members of the Nucleophosmin/Nucleoplasmin Family of Nuclear Chaperones. *Genetics*, 173(4), 1835. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.106.058990>
- Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H. D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., & Dörken, B. (1999). Overexpression of I Kappa B Alpha Without Inhibition of NF-κB Activity and Mutations in the I Kappa B Alpha Gene in Reed-Sternberg Cells. *Blood*, 94(9), 3129–3134. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.9.3129>
- Falini, B. (2001). Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. *British Journal of Haematology*, 114(4), 741–760. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2001.02896.X>
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettirossi, V., Saglio, G., ... Martelli, M. F. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England Journal of Medicine*, 352(3), 254–266. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA041974>
- Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M. P., Liso, A., Gorello, P., Mandelli, F., Mecucci, C., & Martelli, M. F. (2007). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*, 92(4), 519–532. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.11007>
- FastStart TaqMan® Probe Master*. (n.d.). Retrieved March 24, 2025, from <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/product/roche/fstmpmmro?srsId=AfmBOoo2HOUNSqCxZV0z0cBXP4-JxLupuguQAmOWD5YQ8x3xhR5EfvVy>
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T. S., Mitrea, D. M., Zhu, L., Richardson, T. M., Kriwacki, R. W., Pappu, R. V., & Brangwynne, C. P. (2016). Coexisting liquid phases underlie nucleolar sub-compartments. *Cell*, 165(7), 1686. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.04.047>
- Ferreri, A. J. M., Govi, S., Pileri, S. A., & Savage, K. J. (2012). Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 83(2), 293–302. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2012.02.005>

- Friboulet, L., Li, N., Katayama, R., Lee, C. C., Gainor, J. F., Crystal, A. S., Michellys, P. Y., Awad, M. M., Yanagitani, N., Kim, S., Pferdekamper, A. M. C., Li, J., Kasibhatla, S., Sun, F., Sun, X., Hua, S., McNamara, P., Mahmood, S., Lockerman, E. L., ... Engelman, J. A. (2014). The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discovery*, 4(6), 662. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0846>
- Gadad, S. S., Senapati, P., Syed, S. H., Rajan, R. E., Shandilya, J., Swaminathan, V., Chatterjee, S., Colombo, E., Dimitrov, S., Pelicci, P. G., Ranga, U., & Kundu, T. K. (2011). The multifunctional protein nucleophosmin (NPM1) is a human linker histone H1 chaperone. *Biochemistry*, 50(14), 2780–2789. <https://doi.org/10.1021/BI101835J>
- George, R. E., Sanda, T., Hanna, M., Fröhling, S., Luther, W., Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W. B., McGrady, P., Xue, L., Zozulya, S., Gregor, V. E., Webb, T. R., Gray, N. S., Gilliland, D. G., Diller, L., Greulich, H., Morris, S. W., ... Look, A. T. (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 975. <https://doi.org/10.1038/NATURE07397>
- Geraldo, M. V., Yamashita, A. S., & Kimura, E. T. (2011). MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene* 2012 31:15, 31(15), 1910–1922. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.381>
- Goel, H., Rahul, E., Gupta, A. K., Meena, J. P., Chopra, A., Ranjan, A., Hussain, S., Rath, G. K., & Tanwar, P. (2020). Molecular update on biology of Wilms Tumor 1 gene and its applications in acute myeloid leukemia. *American Journal of Blood Research*, 10(5), 151. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7675129/>
- Graetz, D., Crews, K. R., Azzato, E. M., Singh, R. K., Raimondi, S., Mason, J., Valentine, M., Mullighan, C. G., Holland, A., Inaba, H., & Leventaki, V. (2019). Leukemic presentation of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma with a novel partner, poly(A) binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1), responding to single-agent crizotinib. *Haematologica*, 104(5), e218. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2018.215103>
- Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., & Pandolfi, P. P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*, 437(7055), 147–153. <https://doi.org/10.1038/NATURE03915>

- Gromowsky, M. J., D'Angelo, C. R., Lunning, M. A., & Armitage, J. O. (2023). ALK-positive anaplastic large cell lymphoma in adults. *Faculty Reviews*, 12, 21. <https://doi.org/10.12703/R/12-21>
- Gruss, H. J., Pinto, A., Gloghini, A., Wehnes, E., Wright, B., Boiani, N., Aldinucci, D., Gattei, V., Zagonel, V., Smith, C. A., Kadin, M. E., Von Schilling, C., Goodwin, R. G., Herrmann, F., & Carbone, A. (1996). CD30 ligand expression in nonmalignant and Hodgkin's disease-involved lymphoid tissues. *The American Journal of Pathology*, 149(2), 469. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1865328/>
- Gu, T. L., Tothova, Z., Scheijen, B., Griffin, J. D., Gilliland, D. G., & Sternberg, D. W. (2004). NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood*, 103(12), 4622–4629. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-03-0820>
- Guan, J., Umapathy, G., Yamazaki, Y., Wolfstetter, G., Mendoza, P., Pfeifer, K., Mohammed, A., Hugosson, F., Zhang, H., Hsu, A. W., Halenbeck, R., Hallberg, B., & Palmer, R. H. (2015). FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase. *ELife*, 4(September 2015). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.09811>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/ETM.2020.8454>
- Hallberg, B., & Palmer, R. H. (2016). The role of the ALK receptor in cancer biology. *Annals of Oncology*, 27, iii4–iii15. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW301>
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3–14. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.05.001>
- Hansen, H. P., Recke, A., Reineke, U., Von Tresckow, B., Borchmann, P., Von Strandmann, E. P., Lange, H., Lemke, H., & Engert, A. (2004). The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(7), 893–895. <https://doi.org/10.1096/FJ.03-0901FJE>
- Harshitha, R., & Arunraj, D. R. (2021). Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), 800–812. <https://doi.org/10.1002/BMB.21552>

- Hassler, M. R., Pulverer, W., Lakshminarasimhan, R., Redl, E., Hacker, J., Garland, G. D., Merkel, O., Schiefer, A. I., Simonitsch-Klupp, I., Kenner, L., Weisenberger, D. J., Weinhaeusel, A., Turner, S. D., & Egger, G. (2016). Insights into the Pathogenesis of Anaplastic Large-Cell Lymphoma through Genome-wide DNA Methylation Profiling. *Cell Reports*, 17(2), 596. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.09.018>
- Hernández, L., Pinyol, M., Hernández, S., Beà, S., Pulford, K., Rosenwald, A., Lamant, L., Falini, B., Ott, G., Mason, D. Y., Delsol, G., & Campo, E. (1999). TRK-Fused Gene (TFG) Is a New Partner of ALK in Anaplastic Large Cell Lymphoma Producing Two Structurally Different TFG-ALK Translocations. *Blood*, 94(9), 3265–3268. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.9.3265>
- Hindley, A., Catherwood, M. A., McMullin, M. F., & Mills, K. I. (2021). Significance of NPM1 Gene Mutations in AML. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10040. <https://doi.org/10.3390/IJMS221810040>
- Hirsch, B., Hummel, M., Bentink, S., Fouladi, F., Spang, R., Zollinger, R., Stein, H., & Dürkop, H. (2008). CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *The American Journal of Pathology*, 172(2), 510–520. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2008.070858>
- Holmberg Olausson, K., Elsir, T., Moazemi Goudarzi, K., Nistér, M., & Lindström, M. S. (2015). NPM1 histone chaperone is upregulated in glioblastoma to promote cell survival and maintain nucleolar shape. *Scientific Reports*, 5, 16495. <https://doi.org/10.1038/SREP16495>
- Horie, R., Aizawa, S., Nagai, M., Ito, K., Higashihara, M., Ishida, T., Inoue, J., & Watanabe, T. (1998). A novel domain in the CD30 cytoplasmic tail mediates NFkappaB activation. *International Immunology*, 10(2), 203–210. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/10.2.203>
- Hu, G., & Feldman, A. L. (2020). Drivers of crizotinib resistance in ALK+ ALCL. *Blood*, 136(14), 1573–1575. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2020007226>
- Huang, H. (2018). Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Receptor Tyrosine Kinase: A Catalytic Receptor with Many Faces. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3448. <https://doi.org/10.3390/IJMS19113448>
- Ishii, K., Tamura, T., Hatori, K., Himi, K., Nakamura, T., Toyama, Y., Miyata, T., & Takeichi, O. (2023). Elevated Foxo3a and Fas-ligand expression in human periapical

- granulomas as a potential treatment target. *Oral Diseases*, 29(3), 1128–1136. <https://doi.org/10.1111/ODI.14052>
- Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., Mori, S., Ratzkin, B., & Yamamoto, T. (1997). Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997 14:4, 14(4), 439–449. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200849>
- Jacobsen, E. D., Sharman, J. P., Oki, Y., Advani, R. H., Winter, J. N., Bello, C. M., Spitzer, G., Palanca-Wessels, M. C., Kennedy, D. A., Levine, P., Yang, J., & Bartlett, N. L. (2015). Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood*, 125(9), 1394–1402. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-09-598763>
- Jamil, A., & Mukkamalla, S. K. R. (2023). Lymphoma. *Essential Paediatric Surgery: A Practical Guide*, 344–347. <https://doi.org/10.1201/9781003182290-64>
- Joshi, C. J., Ke, W., Drangowska-Way, A., O'Rourke, E. J., & Lewis, N. E. (2022). What are housekeeping genes? *PLOS Computational Biology*, 18(7), e1010295. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1010295>
- Kalinová, M. (2013). Minimální reziduální nemoc – možnosti detekce u hematologických i nehematologických malignit. *Česko-Slovenská Patologie*, 4, 131–138. <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-patologie/2013-4-5/minimalni-rezidualni-nemoc-moznosti-detekce-u-hematologickych-i-nehematologickych-malignit-42286>
- Kalinova, M., Krskova, L., Brizova, H., Kabickova, E., Kepak, T., & Kodet, R. (2008). Quantitative PCR detection of NPM/ALK fusion gene and CD30 gene expression in patients with anaplastic large cell lymphoma—Residual disease monitoring and a correlation with the disease status. *Leukemia Research*, 32(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2007.01.002>
- Kalinova, M., Mrhalova, M., Kabickova, E., Svaton, M., Skotnicova, A., Prouzova, Z., Krenova, Z., Kolenova, A., Divoka, M., Fronkova, E., & Kodet, R. (2024). Molecular Screening in Anaplastic Lymphoma Kinase–Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma: Anaplastic Lymphoma Kinase Analysis, Next-Generation Sequencing Fusion Gene

- Detection, and T-Cell Receptor Immunoprofiling. *Modern Pathology*, 37(3), 100428. <https://doi.org/10.1016/J.MODPAT.2024.100428>
- Karube, K., Kakimoto, Y., Tonozuka, Y., & Ohshima, K. (2021). The expression of CD30 and its clinico-pathologic significance in peripheral T-cell lymphomas. *Expert Review of Hematology*, 14(8), 777–787. <https://doi.org/10.1080/17474086.2021.1955344>
- Kasprzycka, M., Marzec, M., Liu, X., Zhang, Q., & Wasik, M. A. (2006). Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9964–9969. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0603507103/ASSET/2340DFCB-8D30-41F3-8199-600D825CE4E1/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0240625060006.JPEG>
- Katz, J., Janik, J. E., & Younes, A. (2011). Brentuximab Vedotin (SGN-35). *Clinical Cancer Research*, 17(20), 6428–6436. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0488>
- Koff, J. L., Chihara, D., Phan, A., Nastoupil, L. J., Williams, J. N., & Flowers, C. R. (2015). To Each Its Own: Linking the Biology and Epidemiology of NHL Subtypes. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 10(3), 244. <https://doi.org/10.1007/S11899-015-0267-0>
- Kourentzi, K., Crum, M., Patil, U., Prebisch, A., Chavan, D., Vu, B., Zeng, Z., Litvinov, D., Zu, Y., & Willson, R. C. (2020). Recombinant expression, characterization, and quantification in human cancer cell lines of the Anaplastic Large-Cell Lymphoma-characteristic NPM-ALK fusion protein. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61936-w>
- Krumbholz, M., Woessmann, W., Zierk, J., Seniuk, D., Ceppi, P., Zimmermann, M., Singh, V. K., Metzler, M., Damm-Welk, C., Krumbholz, M., Woessmann, W., Zierk, J., Seniuk, D., Ceppi, P., Zimmermann, M., Singh, V. K., Metzler, M., & Damm-Welk, C. (2018). Characterization and diagnostic application of genomic NPM-ALK fusion sequences in anaplastic large-cell lymphoma. *Oncotarget*, 9(41), 26543–26555. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.25489>
- Kung Sutherland, M. S., Sanderson, R. J., Gordon, K. A., Andreyka, J., Cervený, C. G., Yu, C., Lewis, T. S., Meyer, D. L., Zabinski, R. F., Doronina, S. O., Senter, P. D., Law, C. L., & Wahl, A. F. (2006). Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism

- confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 10540–10547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510026200>
- Kurdi, A., De Meyer, G. R. Y., & Martinet, W. (2016). Potential therapeutic effects of mTOR inhibition in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 82(5), 1267–1279. <https://doi.org/10.1111/BCP.12820>
- Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T. M., Ojala, P. M., Meek, D., & Laiho, M. (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*, 5(5), 465–475. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00110-2)
- Lamant, L., Dastugue, N., Pulford, K., Delsol, G., & Mariamé, B. (1999). A New Fusion Gene TPM3-ALK in Anaplastic Large Cell Lymphoma Created by a (1;2)(q25;p23) Translocation. *Blood*, 93(9), 3088–3095. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V93.9.3088>
- Lamant, L., Gascoyne, R. D., Duplantier, M. M., Armstrong, F., Raghav, A., Chhanabhai, M., Rajcan-Separovic, E., Raghav, J., Delsol, G., & Espinos, E. (2003). Non-muscle myosin heavy chain (MYH9): a new partner fused to ALK in anaplastic large cell lymphoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 37(4), 427–432. <https://doi.org/10.1002/GCC.10232>
- Lazarchick, J. 'Krings, G. (2011). *Anaplastic Large Cell Lymphoma Involving the Bone Marrow - 4*.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Kim, S., Park, E. J., Yun, Y., & Kwon, J. (2005). A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks. *Biochemical Journal*, 388(Pt 1), 7. <https://doi.org/10.1042/BJ20042033>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.06.011>
- Li, Z., Guo, W., & Bai, O. (2023). Mechanism of action and therapeutic targeting of CD30 molecule in lymphomas. *Frontiers in Oncology*, 13, 1301437. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1301437/BIBTEX>

- Li, Z., Yang, Y., Wu, K., Li, Y., & Shi, M. (2023). Myeloid leukemia factor 1: A “double-edged sword” in health and disease. *Frontiers in Oncology*, *13*, 1124978. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1124978/BIBTEX>
- Liang, X., Meech, S. J., Odom, L. F., Bitter, M. A., Ryder, J. W., Hunger, S. P., Lovell, M. A., Meltesen, L., Wei, Q., Williams, S. A., Hutchinson, R. N., & McGavran, L. (2004). Assessment of t(2;5)(p23;q35) translocation and variants in pediatric ALK⁺ anaplastic large cell lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, *121*(4), 496–506. <https://doi.org/10.1309/TLE8-FN6E-YF0N-JGP7>
- Liu, C., Iqbal, J., Teruya-Feldstein, J., Shen, Y., Dabrowska, M. J., Dybkaer, K., Lim, M. S., Piva, R., Barreca, A., Pellegrino, E., Spaccarotella, E., Lachel, C. M., Kucuk, C., Jiang, C. S., Hu, X., Bhagavathi, S., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Aoun, P., ... Chan, W. C. (2013). microRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, *122*(12), 2083. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-08-447375>
- Liu, X., Liu, D., Qian, D., Dai, J., An, Y., Jiang, S., Stanley, B., Yang, J., Wang, B., Liu, X., & Liu, D. X. (2012). Nucleophosmin (NPM1/B23) Interacts with Activating Transcription Factor 5 (ATF5) Protein and Promotes Proteasome- and Caspase-dependent ATF5 Degradation in Hepatocellular Carcinoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(23), 19599. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.363622>
- Liu, Y., Zhang, F., Zhang, X. F., Qi, L. S., Yang, L., Guo, H., & Zhang, N. (2012). Expression of Nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. *Journal of Biomedical Science*, *19*(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-53>
- Lodish, U. H. (2016). *Molecular Cell Biology* (8 ed). W.H. Freeman.
- Lorén, C. E., Englund, C., Grabbe, C., Hallberg, B., Hunter, T., & Palmer, R. H. (2003). A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Reports*, *4*(8), 781. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.EMBOR897>
- Mafra, A., Laversanne, M., Gospodarowicz, M., Klinger, P., De Paula Silva, N., Piñeros, M., Steliarova-Foucher, E., Bray, F., & Znaor, A. (2022). Global patterns of non-Hodgkin

- lymphoma in 2020. *International Journal of Cancer*, 151(9), 1474–1481. <https://doi.org/10.1002/IJC.34163>
- Mao, X., Liu, C., Tong, H., Chen, Y., & Liu, K. (2019). Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *American Journal of Translational Research*, 11(12), 7209. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6943456/>
- Martin, D., Smith, S. C., Chesney, A., Jackson-Cook, C., & Pillappa, R. (2022). Too Sensitive or Just Right?: A Comparison of Two ALK Antibodies (D5F3 and ALK1) for Assessment of Anaplastic Large Cell Lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 158(2), 283–290. <https://doi.org/10.1093/AJCP/AQAC043>
- Marzec, M., Kasprzycka, M., Liu, X., El-Salem, M., Halasa, K., Raghunath, P. N., Bucki, R., Wlodarski, P., & Wasik, M. A. (2007). Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway. *Oncogene* 2007 26:38, 26(38), 5606–5614. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210346>
- Marzec, M., Kasprzycka, M., Liu, X., Raghunath, P. N., Wlodarski, P., & Wasik, M. A. (2006). Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf. *Oncogene* 2007 26:6, 26(6), 813–821. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209843>
- Marzec, M., Liu, X., Wong, W., Yang, Y., Pasha, T., Kantekure, K., Zhang, P., Woetmann, A., Cheng, M., Odum, N., & Wasik, M. A. (2011). Oncogenic kinase NPM/ALK induces expression of HIF1 α mRNA. *Oncogene*, 30(11), 1372–1378. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.505>
- Marzec, M., Zhang, Q., Goradia, A., Raghunath, P. N., Liu, X., Paessler, M., Hong, Y. W., Wysocka, M., Cheng, M., Ruggeri, B. A., & Wasik, M. A. (2008). Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20852. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0810958105>
- Mikoshiba, K. (2015). Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Advances in Biological Regulation*, 57, 217–227. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOR.2014.10.001>

- Mir, S. S., Richter, B. W. M., & Duckett, C. S. (2000). Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood*, 96(13), 4307–4312. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V96.13.4307>
- MiSeq Reagent Kit v3 | Highest output of MiSeq kits. (n.d.). Retrieved April 10, 2025, from <https://emea.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/miseq-reagent-kit-v3.html>
- Montecucco, A., Zanetta, F., & Biamonti, G. (2015). Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI Journal*, 14, 95. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2015-561>
- Montes-Mojarro, I. A., Steinhilber, J., Bonzheim, I., Quintanilla-Martinez, L., & Fend, F. (2018). The Pathological Spectrum of Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL). *Cancers* 2018, Vol. 10, Page 107, 10(4), 107. <https://doi.org/10.3390/CANCERS10040107>
- Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L., & Look, A. T. (1994). Fusion of a Kinase Gene, ALK, to a Nucleolar Protein Gene, NPM, in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Science*, 263(5151), 1281–1284. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8122112>
- Moubadder, L., McCullough, L. E., Flowers, C. R., & Koff, J. L. (2020). Linking environmental exposures to molecular pathogenesis in Non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 29(10), 1844–1855. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0228/70415/AM/LINKING-ENVIRONMENTAL-EXPOSURES-TO-MOLECULAR>
- Mourali, J., Bénard, A., Lourenço, F. C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P., Delsol, G., & Allouche, M. (2006). Anaplastic Lymphoma Kinase Is a Dependence Receptor Whose Proapoptotic Functions Are Activated by Caspase Cleavage. *Molecular and Cellular Biology*, 26(16), 6209. <https://doi.org/10.1128/MCB.01515-05>
- Mussolin, L., Damm-Welk, C., Pillon, M., & Woessmann, W. (2021). Minimal Disease Monitoring in Pediatric Non-Hodgkin's Lymphoma: Current Clinical Application and Future Challenges. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 1907, 13(8), 1907. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13081907>

- Nirmal, Rm. (2020). Diagnosis of malignant lymphoma – An overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 24(2), 195. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.294653>
- Nishimura, H., Yajima, T., Muta, H., Podack, E. R., Tani, K., & Yoshikai, Y. (2005). A Novel Role of CD30/CD30 Ligand Signaling in the Generation of Long-Lived Memory CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4627–4634. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.7.4627>
- Norimatsu, Y., Akatsuka, T., Matsuoka, A., Hamada, T., Mori, I., Shiomi, T., Mori, N., Onishi, K., Togashi, Y., Inoue, N., Takeuchi, K., & Sugaya, M. (2024). Detection of TRAF1-ALK fusion in skin lesions of systemic ALK⁺ anaplastic large cell lymphoma initially involving the skin and the draining lymph node. *The Journal of Dermatology*, 51(1), 120–124. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.16981>
- Novakovic, B. J. (2015). Immunotoxin-a new treatment option in patients with relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Radiology and Oncology*, 49(4), 315–319. <https://doi.org/10.1515/RAON-2015-0036>
- Oflazoglu, E., Grewal, I. S., & Gerber, H. (2009). Targeting CD30/CD30L in Oncology and Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 647, 174–185. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89520-8_12
- Okuda, M., Horn, H. F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A. G., Chan, P. K., Knudsen, E. S., Hofmann, I. A., Snyder, J. D., Bove, K. E., & Fukasawa, K. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, 103(1), 127–140. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00093-3)
- Osorio, F. G., Soria-Valles, C., Santiago-Fernández, O., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2016). NF-κB signaling as a driver of ageing. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 326, 133–174. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.04.003>
- Palacios, G., Shaw, T. I., Li, Y., Singh, R. K., Valentine, M., Sandlund, J. T., Lim, M. S., Mullighan, C. G., & Leventaki, V. (2016). Novel ALK fusion in anaplastic large cell lymphoma involving EEF1G, a subunit of the eukaryotic elongation factor-1 complex. *Leukemia*, 31(3), 743. <https://doi.org/10.1038/LEU.2016.331>
- Pandiar, D., & Smitha, T. (2019). The “hallmark” cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 23(2), 176. https://doi.org/10.4103/JOMFP.JOMFP_177_19

- Paplomata, E., & O'regan, R. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 6(4), 154. <https://doi.org/10.1177/1758834014530023>
- Paul, A., Acharya, K., & Chakraborty, N. (2023). Biosynthesis, extraction, detection and pharmacological attributes of vinblastine and vincristine, two important chemotherapeutic alkaloids of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: A review. *South African Journal of Botany*, 161, 365–376. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2023.08.034>
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Peripheral T-Cell Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. *PDQ Cancer Information Summaries*. <https://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/peripheral-t-cell-lymphoma-pdq>
- Pearson, J. D., Lee, J. K. H., Bacani, J. T. C., Lai, R., & Ingham, R. J. (2012). NPM-ALK: The Prototypic Member of a Family of Oncogenic Fusion Tyrosine Kinases. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 123253. <https://doi.org/10.1155/2012/123253>
- Piva, R., Pellegrino, E., Mattioli, M., Agnelli, L., Lombardi, L., Boccalatte, F., Costa, G., Ruggeri, B. A., Cheng, M., Chiarle, R., Palestro, G., Neri, A., & Inghirami, G. (2006). Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and Bcl2A1 as critical target genes. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3171. <https://doi.org/10.1172/JCI29401>
- Prokoph, N., Matthews, J. D., Trigg, R. M., Montes-Mojarro, I. A., Burke, G. A. A., Fend, F., Merkel, O., Kenner, L., Geoerger, B., Johnston, R., Murray, M. J., Rigaud, C., Brugières, L., & Turner, S. D. (2023). Patient-derived xenograft models of ALK⁺ ALCL reveal preclinical promise for therapy with brigatinib. *British Journal of Haematology*, 202(5), 985–994. <https://doi.org/10.1111/BJH.18953>
- Quan, P. L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(4), 1271. <https://doi.org/10.3390/S18041271>
- Quelen, C., Grand, D., Sarot, E., Brugières, L., Sibon, D., Pradines, A., Laurent, C., Brousset, P., & Lamant, L. (2021). Minimal Residual Disease Monitoring Using a 3'ALK Universal Probe Assay in ALK-Positive Anaplastic Large-Cell Lymphoma: ddPCR, an Attractive Alternative Method to Real-Time Quantitative PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2020.11.002>

- Rassidakis, G. Z., Feretzaki, M., Atwell, C., Grammatikakis, I., Lin, Q., Lai, R., Claret, F. X., Medeiros, L. J., & Amin, H. M. (2005). Inhibition of Akt increases p27Kip1 levels and induces cell cycle arrest in anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, *105*(2), 827–829. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-06-2125>
- Regad, T. (2015). Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers 2015*, Vol. 7, Pages 1758–1784, *7*(3), 1758–1784. <https://doi.org/10.3390/CANCERS7030860>
- Riera, L., Lasorsa, E., Ambrogio, C., Surrenti, N., Voena, C., & Chiarle, R. (2010). Involvement of Grb2 adaptor protein in nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK)-mediated signaling and anaplastic large cell lymphoma growth. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(34), 26441–26450. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.116327/ATTACHMENT/DB116D1F-7358-4391-8836-7371C392B894/MMC1.PDF>
- Rindone, G., Aroldi, A., Bossi, E., Verga, L., Zambrotta, G., Tarantino, S., Piazza, R., Mussolin, L., Chiarle, R., & Gambacorti-Passerini, C. (2023). A monocentric analysis of the long-term safety and efficacy of crizotinib in relapsed/refractory ALK+ lymphomas. *Blood Advances*, *7*(3), 314–316. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2022007538>
- Ripamonti, A., Aroldi, A., Cocito, F., Guerra, L., Monaco, L., Granelli, B. M., Mussolin, L., & Gambacorti-Passerini, C. (2023). Preliminary Results of Phase 2 Open Label Study of Lorlatinib Monotherapy in Relapsed/Refractory ALK + Lymphomas Previously Treated with Other Tyrosine Kinase Inhibitors. *Blood*, *142*(Supplement 1), 4474. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2023-186702>
- Rust, R., Harms, G., Blokzijl, T., Boot, M., Diepstra, A., Kluiver, J., Visser, L., Peh, S. C., Lim, M., Kamps, W. A., Poppema, S., & Van Den Berg, A. (2005). High expression of Mcl-1 in ALK positive and negative anaplastic large cell lymphoma. *Journal of Clinical Pathology*, *58*(5), 520. <https://doi.org/10.1136/JCP.2004.022335>
- Schirrmann, T., Steinwand, M., Wezler, X., Ten Haaf, A., Tur, M. K., & Barth, S. (2014). CD30 as a therapeutic target for lymphoma. *BioDrugs*, *28*(2), 181–209. <https://doi.org/10.1007/S40259-013-0068-8>
- Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., & Diehl, V. (1982). Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg–Reed cells of

- Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 1982 299:5878, 299(5878), 65–67. <https://doi.org/10.1038/299065a0>
- Schwarting, R., Gerdes, J., Durkop, H., Falini, B., Pileri, S., & Stein, H. (1989). BER-H2: A New Anti-Ki-1 (CD30) Monoclonal Antibody Directed at a Formol-Resistant Epitope. *Blood*, 74(5), 1678–1689. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V74.5.1678.1678>
- Shiota, M., Fujimoto, J., Semba, T., Satoh, H., Yamamoto, T., & Mori, S. (1994). Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene*, 9(6), 1567–1574. <https://europepmc.org/article/med/8183550>
- Singh, R., Shaik, S., Negi, B., Rajguru, J., Patil, P., Parihar, A., & Sharma, U. (2020). Non-Hodgkin's lymphoma: A review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(4), 1834. https://doi.org/10.4103/JFMPC.JFMPC_1037_19
- Smith, C. A., Gruss, H. J., Davis, T., Anderson, D., Farrah, T., Baker, E., Sutherland, G. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Grabstein, K. H., Gliniak, B., McAlister, I. B., Fanslow, W., Alderson, M., Falk, B., Gimpel, S., Gillis, S., Din, W. S., ... Armitage, R. J. (1993). CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell*, 73(7), 1349–1360. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90361-S](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90361-S)
- Sotomayor E, Young K, & Younes Anas. (2014). Clinical roundtable monograph: CD30 in lymphoma: its role in biology, diagnostic testing, and targeted therapy . *Clinical Advances in Hematology & Oncology* , 12(4).
- Spaccarotella, E., Pellegrino, E., Ferracin, M., Ferreri, C., Cuccuru, G., Liu, C., Iqbal, J., Cantarella, D., Taulli, R., Provero, P., Cunto, F. Di, Medico, E., Negrini, M., Chan, W. C., Inghirami, G., & Piva, R. (2014). STAT3-mediated activation of microRNA cluster 17~92 promotes proliferation and survival of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica*, 99(1), 116. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2013.088286>
- Stadler, S., Singh, V. K., Knörr, F., Damm-Welk, C., & Woessmann, W. (2018). Immune Response against ALK in Children with ALK-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Cancers*, 10(4), 114. <https://doi.org/10.3390/CANCERS10040114>

- Staudacher, A. H., & Brown, M. P. (2017). Antibody drug conjugates and bystander killing: is antigen-dependent internalisation required? *British Journal of Cancer*, 117(12), 1736. <https://doi.org/10.1038/BJC.2017.367>
- Stein, H., Mason, D., Gerdes, J., O'Connor, N., Wainscoat, J., Pallesen, G., Gatter, K., Falini, B., Delsol, G., Lemke, H., Schwarting, R., & Lennert, K. (1985). The Expression of the Hodgkin's Disease Associated Antigen Ki-1 in Reactive and Neoplastic Lymphoid Tissue: Evidence That Reed-Sternberg Cells and Histiocytic Malignancies Are Derived From Activated Lymphoid Cells. *Blood*, 66(4), 848–858. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V66.4.848.848>
- Steinhilber, J., Bonin, M., Walter, M., Fend, F., Bonzheim, I., & Quintanilla-Martinez, L. (2015). Next-Generation Sequencing Identifies Deregulation of MicroRNAs Involved in Both Innate and Adaptive Immune Response in ALK+ ALCL. *PLOS ONE*, 10(2), e0117780. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0117780>
- Subbiah, V., Kuravi, S., Ganguly, S., Welch, D. R., Vivian, C. J., Mushtaq, M. U., Hegde, A., Iyer, S., Behrang, A., Ali, S. M., Madison, R. W., Venstrom, J. M., Jensen, R. A., McGuirk, J. P., Amin, H. M., & Balusu, R. (2021). Precision therapy with anaplastic lymphoma kinase inhibitor ceritinib in ALK-rearranged anaplastic large cell lymphoma. *ESMO Open*, 6(4), 100172. <https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2021.100172>
- Sun, K., Luo, J., Guo, J., Yao, X., Jing, X., & Guo, F. (2020). The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 28(4), 400–409. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2020.02.027>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- TaqManTM Universal PCR Master Mix*. (n.d.). Retrieved March 24, 2025, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4304437>
- Tort, F., Pinyol, M., Pulford, K., Roncador, G., Hernandez, L., Nayach, I., Kluin-Nelemans, H. C., Kluin, P., Touriol, C., Delsol, G., Mason, D., & Campo, E. (2001). Molecular characterization of a new ALK translocation involving moesin (MSN-ALK) in anaplastic

- large cell lymphoma. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 81(3), 419–426. <https://doi.org/10.1038/LABINVEST.3780249>
- Twohig, J. P., Cuff, S. M., Yong, A. A., & Wang, E. C. Y. (2011). The role of tumor necrosis factor receptor superfamily members in mammalian brain development, function and homeostasis. *Reviews in the Neurosciences*, 22(5), 509. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.041>
- Vega, F., Medeiros, L. J., Leventaki, V., Atwell, C., Cho-Vega, J. H., Tian, L., Claret, F. X., & Rassidakis, G. Z. (2006). Activation of Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Contributes to Tumor Cell Survival in Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Cancer Research*, 66(13), 6589. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3018>
- Wahl, A. F., Klussman, K., Thompson, J. D., Chen, J. H., Francisco, L. V, Risdon, G., Chace, D. F., Siegall, C. B., & Francisco, J. A. (2002). The Anti-CD30 Monoclonal Antibody SGN-30 Promotes Growth Arrest and DNA Fragmentation in Vitro and Affects Antitumor Activity in Models of Hodgkin's Disease. *Cancer Research*, 62(13), 3736–3742.
- Wang, H. W., Balakrishna, J. P., Pittaluga, S., & Jaffe, E. S. (2019). Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *British Journal of Haematology*, 184(1), 45–59. <https://doi.org/10.1111/BJH.15614>
- Wang, Y., He, J., Xu, M., Xue, Q., Zhu, C., Liu, J., Zhang, Y., & Shi, W. (2022). Holistic View of ALK TKI Resistance in ALK-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 815654. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.815654/XML/NLM>
- Wei, Z., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 2002 12:1, 12(1), 9–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- Weniger, M. A., & Küppers, R. (2021). Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2021 35:4, 35(4), 968–981. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01204-6>
- Woessmann, W., Peters, C., Lenhard, M., Burkhardt, B., Sykora, K. W., Dilloo, D., Kremens, B., Lang, P., Führer, M., Kühne, T., Parwaresch, R., Ebell, W., & Reiter, A. (2006). Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in relapsed or refractory anaplastic

- large cell lymphoma of children and adolescents – a Berlin–Frankfurt–Münster group report. *British Journal of Haematology*, 133(2), 176–182. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2006.06004.X>
- Wood, K. M., Roff, M., & Hay, R. T. (1998). Defective I κ B α in Hodgkin cell lines with constitutively active NF- κ B. *Oncogene* 1998 16:16, 16(16), 2131–2139. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201735>
- Wu, R., & Lim, M. S. (2023). Updates in pathobiological aspects of anaplastic large cell lymphoma. *Frontiers in Oncology*, 13, 1241532. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1241532>
- Xing, X., & Feldman, A. L. (2015). Anaplastic large cell lymphomas: ALK positive, ALK negative, and primary cutaneous. *Advances in Anatomic Pathology*, 22(1), 29–49. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000047>
- Xu, M. L., Gabali, A., Hsi, E. D., Fedoriw, Y., Vij, K., Salama, M. E., Ramchandren, R., O'Malley, D., Wick, M. R., Battistella, M., & Gru, A. A. (2020). Practical Approaches on CD30 Detection and Reporting in Lymphoma Diagnosis. *American Journal of Surgical Pathology*, 44(2), E1–E14. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001368>
- Yu, Y., Maggi, L. B., Brady, S. N., Apicelli, A. J., Dai, M.-S., Lu, H., & Weber, J. D. (2006). Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export. *Molecular and Cellular Biology*, 26(10), 3798. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.10.3798-3809.2006>
- Zamo, A., Chiarle, R., Piva, R., Howes, J., Fan, Y., Chilosi, M., Levy, D. E., & Inghirami, G. (2002). Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 2002 21:7, 21(7), 1038–1047. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205152>
- Zarka, J., Short, N. J., Kanagal-Shamanna, R., & Issa, G. C. (2020). Nucleophosmin 1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Genes*, 11(6), 649. <https://doi.org/10.3390/GENES11060649>
- Zhang, H., Pao, L. I., Zhou, A., Brace, A. D., Halenbeck, R., Hsu, A. W., Bray, T. L., Hestir, K., Bosch, E., Lee, E., Wang, G., Liu, H., Wong, B. R., Kavanaugh, W. M., & Williams, L. T. (2014). Deorphanization of the human leukocyte tyrosine kinase (LTK) receptor by a signaling screen of the extracellular proteome. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 111(44), 15741–15745.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1412009111/SUPPL_FILE/PNAS.201412009SI.PDF

Zhang, Q., Wang, H. Y., Kantekure, K., Paterson, J. C., Liu, X., Schaffer, A., Paulos, C., Milone, M. C., Odum, N., Turner, S., Marafioti, T., & Wasik, M. A. (2011). Oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK induces expression of the growth-promoting receptor ICOS. *Blood*, 118(11), 3062. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-01-332916>

Zhang, X. R., Chien, P. N., Nam, S. Y., & Heo, C. Y. (2022). Anaplastic Large Cell Lymphoma: Molecular Pathogenesis and Treatment. *Cancers 2022*, Vol. 14, Page 1650, 14(7), 1650. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14071650>

Zhu, H., Sarkar, S., Scott, L., Danelisen, I., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016). Doxorubicin Redox Biology: Redox Cycling, Topoisomerase Inhibition, and Oxidative Stress. *Reactive Oxygen Species (Apex, N.C.)*, 1(3), 189. <https://doi.org/10.20455/ROS.2016.835>