

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni
Šiklův patologicky anatomický ústav



Genetické změny adnexálních nádorů kůže

Petr Grossmann

Autoreferát doktorské dizertační práce

Plzeň 2012

Předmluva

Doktorská disertační práce je shrnutím autorovy publikační činnosti v oblasti molekulární patologie. Práce je zaměřena především na studium molekulárních změn vybraných markerů u kožních adnexálních tumorů, avšak stručně zmiňuje i další autorovy práce v ostatních oblastech molekulární patologie.

Spis je členěn do několika částí. V první části stručný teoretický úvod pojednává o studovaných tumorech, syndromech a jednotlivých analyzovaných genech. V dalším oddíle si autor klade za cíl studium změn konkrétních molekulárních markerů u vybraných dědičných syndromů či sporadických nádorových onemocnění. Dále jsou uvedeny výsledky ve formě publikovaných či přijatých prací v časopisech s „impakt“ faktorem. Tyto práce pojednávají o analýzách germinálních a somatických změn genů *CYLD* u pacientů s Brookeovým-Spieglerovým syndromem, genu *PRKAR1A* u pacienta s Carneyho komplexem a změnách genů *hMLH1*, *hMSH2* a *hMSH6* u pacienta s Muirvo-Torreovo syndromem. Ostatní práce se pak zabývají detekcí změn genů *TP53*, *HER2/neu*, *CTNNB1* a možnou přítomností translokace t(11;19)(CRTC1/MAML2) u nejrůznějších typů, často vzácných, sporadických, či se zmiňovanými syndromy asociovaných tumorů. Tyto práce jsou pak v závěru doplněny krátkým komentářem.

V poslední části je soubor abstraktů ostatních autorových prací z dalších oblastí molekulární patologie.

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval především svému školiteli Doc. MUDr. Dmitry V. Kazakovovi, CSc. za odborné vedení při vypracování této dizertační práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Tomáši Vaněčkovi, PhD. za cenné připomínky a všem kolegyním a kolegům ze Šiklova patologicko anatomického ústavu za možnost podílet se na řešení zajímavých výzkumných projektů. Bez nich by tato práce nemohla nikdy vzniknout.

Grantová podpora

Tato práce byla zčásti podpořena grantem IGA MZČR NS 9734.

Prohlášení autora

Autor dizertační práce „Genetické změny adnexálních nádorů kůže“ souhlasí s jejím půjčováním dle zavedených pravidel.

V Plzni 31.1. 2012

Petr Grossmann

Obsah

| | | |
|------|---|----|
| 1. | Gen <i>CYLD</i> | 7 |
| 1.1. | Brookeův-Spieglerův syndrom (BSS)..... | 7 |
| 1.2. | Gen <i>CYLD</i> | 7 |
| 1.3. | Cíle práce..... | 8 |
| 1.4. | Metody..... | 8 |
| 1.5. | Výsledky..... | 9 |
| 1.6. | Závěr..... | 9 |
| 1.7. | Summary..... | 10 |
| 2. | MMR („mismatch repair“) geny <i>hMLH1</i> , <i>hMSH2</i> , <i>hMSH6</i> | 10 |
| 2.1. | Muirův-Torreův syndrom (MTS)..... | 10 |
| 2.2. | Gen <i>hMLH1</i> | 11 |
| 2.3. | Gen <i>hMSH2</i> | 11 |
| 2.4. | Gen <i>hMSH6</i> | 12 |
| 2.5. | Cíle práce..... | 12 |
| 2.6. | Metody..... | 12 |
| 2.7. | Výsledky..... | 12 |
| 2.8. | Závěr..... | 13 |
| 2.9. | Summary..... | 13 |
| 3. | Gen <i>PRKARIA</i> | 13 |
| 3.1. | Carneyho komplex (CNC)..... | 13 |
| 3.2. | Gen <i>PRKARIA</i> | 14 |
| 3.3. | Cíl práce..... | 14 |
| 3.4. | Metody..... | 14 |
| 3.5. | Výsledky..... | 14 |
| 3.6. | Závěr..... | 15 |
| 3.7. | Summary..... | 15 |
| 4. | Gen <i>CTNNB1</i> | 15 |
| 4.1. | Různé adnexální tumory a gen <i>CTNNB1</i> | 15 |
| 4.2. | Gen <i>CTNNB1</i> | 16 |
| 4.3. | Cíl práce..... | 16 |
| 4.4. | Metody..... | 16 |
| 4.5. | Výsledky..... | 16 |
| 4.6. | Závěr..... | 17 |
| 4.7. | Summary..... | 17 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5. | Gen <i>TP53</i> | 17 |
| 5.1. | Maligní tumory vyrůstající na bázi spiradenomů, cylindromů a spiradenocylindromů a gen <i>TP53</i> | 17 |
| 5.2. | Gen <i>TP53</i> | 18 |
| 5.3. | Metody | 19 |
| 5.4. | Výsledky | 19 |
| 5.5. | Závěr | 19 |
| 5.6. | Summary | 20 |
| 5.7. | Hidradenokarcinom | 20 |
| 5.8. | Gen <i>TP53</i> | 20 |
| 5.9. | Cíle práce | 21 |
| 5.10. | Metody | 21 |
| 5.11. | Výsledky | 21 |
| 5.12. | Závěr | 21 |
| 5.13. | Summary | 21 |
| 6. | Gen <i>HER2/neu</i> | 22 |
| 6.1. | Hidradenokarcinom | 22 |
| 6.2. | Gen <i>HER2/neu</i> | 22 |
| 6.3. | Cíle práce | 22 |
| 6.4. | Metody | 22 |
| 6.5. | Výsledky | 23 |
| 6.6. | Závěr | 23 |
| 6.7. | Summary | 23 |
| 7. | Geny <i>CRTC1</i> a <i>MAML2</i> , translokace t(11;19)(<i>CRTC1/MAML2</i>) | 24 |
| 7.1. | Hidradenokarcinom | 24 |
| 7.2. | Geny <i>CRTC1</i> a <i>MAML2</i> , translokace t(11;19)(<i>CRTC1/MAML2</i>) | 24 |
| 7.3. | Cíle práce | 25 |
| 7.4. | Metody | 25 |
| 7.5. | Výsledky | 25 |
| 7.6. | Závěr | 25 |
| 7.7. | Summary | 25 |
| 8. | Seznam použité literatury | 26 |
| 9. | Příloha | 32 |
| 9.1. | Souhrn publikací týkajících se tématu práce – „Genetické změny adnexálních nádorů kůže“, na kterých autor participoval | 32 |
| 9.2. | Souhrn dalších publikací autora dizertační práce | 33 |

1. Gen *CYLD*

1.1. Brookeův-Spieglerův syndrom (BSS)

Brookeův-Spieglerův syndrom (BSS) a jeho fenotypické varianty Familiální cylindromatóza (FC) a Mnohočetný familiální trichoepiteliom (MFT) je dědičné, autozomálně dominantní onemocnění charakterizované rozvojem mnohočetných adnexálních kožních neoplázií, jako jsou spiradenomy, cylindromy, spiradenocylindromy a trichoepiteliomy (= kribriformní trichoblastomy podle poslední WHO klasifikace kožních nádorů). Penetrance onemocnění je vysoká. Kožní léze se u pacientů začínají zpravidla objevovat v časně dospělosti a častěji se vyskytují u žen. Tumory jsou lokalizovány zejména na hlavě a krku s typickým postižením kšticce, obličejové a periaurikulární oblasti. Existují velké rozdíly v klinické prezentaci onemocnění mezi jednotlivými pacienty. Někteří pacienti mohou mít jen několik tumorů, zatímco u jiných se nacházejí stovky lézí postihující kůži celého těla. (*Kazakov et al. 2012*)

Za BSS a jeho fenotypické varianty jsou zodpovědné mutace v genu *CYLD*. (*Bignell et al. 2000, Zhang et al. 2004*)

1.2. Gen *CYLD*

Tumorsupresorový gen *CYLD* (cylindromatosis) je lokalizován v oblasti 16q12-q13. Obsahuje 20 exonů, přičemž první tři exony nejsou translatovány. Jeho cDNA kóduje 956 aminokyselin a produktem je evolučně konzervovaný protein o velikosti 120 kDa. Vyskytuje se však i zkrácená varianta, která postrádá exon 7 a kóduje protein s 953 aminokyselinami. (*Bignell et al. 2000*)

Protein *CYLD* patří do proteinové rodiny DUB (deubiquitinizační proteiny). Enzymy této proteinové rodiny nesou na svém C-konci katalytickou doménu složenou ze dvou konzervovaných subdomén. Ty obsahují aktivní cystein a aktivní histidin, jenž tvoří katalytickou kapsu. Protein *CYLD* dále obsahuje tři CAP-Gly motivy, u kterých se předpokládá, že se podílejí na vazbě k mikrotubulům. (*Bignell et al. 2000*)

Protein *CYLD* svojí deubiquitinizační aktivitou negativně reguluje cytokinem zprostředkovanou aktivaci NF-kappa-B kinázy (NF-κB). (*Karin & Ben-Neriah 2000*)

Většina germinálních mutací nalézáných u genu *CYLD* u pacientů s BSS a jeho fenotypickými variantami patří do skupiny posunových nebo nonsense mutací, které vedou ke zkrácení proteinu a vyřazení katalytické domény z funkce. U genu *CYLD* bylo popsáno pouze malé množství missense mutací. Všechny, kromě jedné, postihují esenciální aminokyseliny v katalytické doméně. (*Bignell et al.* 2000, *Sima et al.* 2010, *Nasti et al.* 2009, *Wang et al.* 2010, *Blake & Toro* 2009, *Amaro et al.* 2010, *Kazakov et al.* 2010, *Scholz et al.* 2010)

V souladu s Knudsonovou teorií inaktivace tumor supresorového genu dochází k úplnému vyřazení funkce genu *CYLD* prostřednictvím druhého zásahu. Ve velkém procentu případů se jedná o inaktivaci způsobenou ztrátou heterozygotnosti (LOH). Byly však nalezeny i alterace na úrovni sekvence. (*Knudson* 1993, *Leonard et al.* 2001, *Sima et al.* 2010)

1.3. Cíle práce

- nalézt nové zárodečné mutace genu *CYLD* u pacientů s BSS a MFT
- analyzovat somatické alterace u mnohočetných nádorů u pacientů s BSS a MFT
- korelovat, pokud to bude možné, typ mutace s fenotypem

1.4. Metody

Izolace DNA byla provedena z krve, zmražených tkání a parafinových bloků komerčně dostupným izolačním kitem na bázi silikátových kolonek dle standardního postupu výrobce. Primery pro PCR amplifikaci byly navrženy tak, aby produkty pokrývaly nejen sekvenci všech 20 kódujících exonů, ale také případnou mutaci v místech sestřihu. Úspěšně amplifikované produkty byly přečištěny a dále sekvenovány. Analýza sekvenačních dat probíhala „in silico“ porovnáním s referenční sekvencí.

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

1.5. Výsledky

V našich pracích jsme analyzovali 67 pacientů ze 48 rodin s fenotypem BSS/MFT na germinální mutace a 90 histologických vzorků tumorů asociovaných s BSS/MFT vybraných z celkového počtu 379 vzorků na germinální a somatické alterace genu *CYLD*. Z analyzovaných 67 pacientů byla germinální mutace nalezena u 51 (76 %) pacientů. Germinální mutace u pacientů s BSS byly nalezeny ve 43 (75 %), a u pacientů s MFT v 8 (57 %) případech.

Nejčastější germinální mutací byla c.1112C>A v exonu 9, která byla nalezena u 6 pacientů z 5 rodin. Vedle této se pak ještě 4 další mutace, konkrétně c.2272C>T, c.2291delAACTA, c.2299A>T a c.2806C>T, vyskytovaly více než u jedné rodiny s fenotypem BSS/MFT. Ostatní germinální mutace byly rodinně specifické.

Mezi 51 detekovanými germinálními mutacemi autor našel 7 dříve nepopsaných variant. Jednalo se o frameshift mutace (c.1027dupA, c.2155dupA, c.2288_2289delTT, c.2641delG), nonsense mutaci c.2713C>T, missense mutaci c.1961T>A a zajímavou intronovou mutaci c.1139-148A>G, která ve svém důsledku vede k intronizaci exonu a narušení čtecího rámce.

Vedle germinálních mutací byly analyzovány také somatické alterace tohoto genu u tumorů asociovaných s fenotypem BSS/MFT, konkrétně spiradenomů, cylindromů, spiradenocylindromů, trichoepiteliomů a některých vzácných adnexálních nádorů. Somatické alterace byly identifikovány v 73 (81%) tumorech, z toho 67 (88 %) u tumorů s nalezenou germinální mutací a 6 (43 %) u tumorů bez germinální mutace, přičemž nejčastějším somatickou mutací byla ztráta heterozygotnosti (LOH). U 16 (24 %) pacientů pak nebyla nalezena ani germinální ani somatická mutace.

Dále byla pomocí statistických metod provedena genotypově-fenotypová analýza, přičemž jsme nepotvrdili přítomnost jakékoliv korelace mezi typem mutace a fenotypovými projevy pacienta.

1.6. Závěr

Celkově náš tým objevil dohromady 19 nových germinálních mutací (22% všech známých), přičemž se autor podílel na objevu 7. Zvláště zajímavým nálezem byl objev

nové intronové mutace genu *CYLD* a charakterizace molekulárních procesů vedoucích k inaktivaci tohoto genu. Autor dále potvrdil přítomnost LOH jako nejčastějšího druhého inaktivačního zásahu. Zároveň našel skupinu pacientů s fenotypem BSS/MFT, kteří nenesou mutaci genu *CYLD*, což by mohlo naznačovat i možnou přítomnost jiného mutovaného genu v patogenezi BSS/MFT. V neposlední řadě pak byla provedena genotypově-fenotypová korelační analýza s negativním výsledkem.

1.7. Summary

Our team discovered 19 new germinal mutations (22% of all known), with author participating on finding of seven of them. Particularly interesting is the discovery of new intronic mutation of *CYLD* gene and characterization of molecular biologic processes causing inactivation of the gene. Author also confirmed presence of LOH being the most frequent second inactivating hit. At the same time author found a group of patients with BSS/MFT phenotype carrying no mutation of *CYLD* gene suggesting that there might exist another gene participating in BSS/MFT pathogenesis. Furthermore genotype-phenotype analysis was performed resulting in no significant correlation.

2. MMR („mismatch repair“) geny *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*

2.1. Muirův-Torreův syndrom (MTS)

Muirův-Torreův syndrom patří mezi autozomálně dominantní dědičná onemocnění. Je kombinací alespoň jednoho nádoru kůže se sebaceózní diferenciací a minimálně jednoho viscerálního nádoru. (Muir *et al.* 1967, Torre 1968) Typickým kožním znakem jsou mnohočetné keratoakantomy, které se exprimují na místech chráněných před sluncem u mladých osob. Častými přidruženými malignitami tohoto syndromu jsou karcinomy gastrointestinálního (cca 50%) a urogenitálního traktu (25%). Nádorům vnitřních orgánů často předcházejí, nebo se vyskytují současně, kožní léze. (Mangold *et al.* 2007, Arnold *et al.* 2007, Murphy *et al.* 2008)

MTS se dnes považuje za fenotypickou variantu mnohem častějšího hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (hereditary nonpolyposis colorectal cancer; HNPCC) neboli Lynchova syndromu. (Mercader 2010)

Kožní léze u MTS zahrnují nádory se sebaceózní diferenciací, a to sebaceózní adenom, sebaceom a extraokulární sebaceózní karcinom. Kožní tumory jsou většinou mnohočetné. (Kazakov *et al.* 2012)

Příčinou vzniku HNPCC a MTS je zárodečná mutace v některém z genů zodpovědných za opravy replikačních chyb v DNA (tzv. mismatch repair genů). Nedílným znakem těchto alterací je i přítomnost tzv. mikrosatelitní nestability, fenoménu charakterizovaného změnami v počtu tandemových repetice mikrosatelitních markerů v tumorech. (Kinzler & Vogelstein 1996)

Na vzniku MTS se podílí především mutace v genech *hMSH2* a *hMLH1*, přičemž zárodečná mutace v genu *hMSH2* je převažující (90%). Velmi vzácně může být příčinou i mutace v genu *hMSH6*. (Mangold *et al.* 2007, Arnold *et al.* 2007, Murphy *et al.* 2008)

2.2. Gen *hMLH1*

Gen *hMLH1* (mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)) je lidský homolog „mismatch“ opravného genu *mutL* bakterie *Escherichia coli*. Je lokalizován v oblasti 3p21.3. Skládá se z 20 exonů, které se všechny, kromě exonu 2, přepisují do RNA. Jeho cDNA obsahuje 2271 bazí a kóduje 756 aminokyselin proteinu MLH1. (Lindblom *et al.* 1993)

MMR proteiny se spojují do funkčních komplexů, protein MLH1 dimerizuje s proteinem PMS2 a tvoří tak komplex MutL alfa, což je součást postreplikačního systému MMR replikačních oprav DNA. Vedle této funkce je pak tento protein či proteinový komplex zahrnut i v mechanismech vedoucích k zastavení buněčného cyklu a apoptóze a to v případech, kdy poškození DNA je natolik rozsáhlé, že je obtížné provést opravy. (Schmutte *et al.* 2001, Dzantiev *et al.* 2004, Li 1999)

2.3. Gen *hMSH2*

Gen *hMSH2* (mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)) je lidský homolog genu *mutS* bakterie *Escherichia coli*. Je lokalizován v 2p21 – 22. Skládá se z 16 exonů, které se všechny přepisují do RNA. Jeho cDNA obsahuje 2805 bazí a kóduje 934 aminokyselin proteinu MSH2. (Peltomäki *et al.* 1993)

Tento protein tvoří heterodimery MutS alfa (komplex proteinů MSH2-MSH6) a MutS beta (komplex proteinů MSH2-MSH3), které vazbou na poškozený řetězec DNA zahajují opravu DNA. MutS alfa rozpoznává na DNA jednonukleotidové záměny a dinukleotidové inserčně deleční smyčky, MutS beta pak větší inserčně-deleční smyčky. (Hsieh & Yamane 2008)

Vedle této funkce se MutS alfa zřejmě též účastní reparačních mechanismů využívající k opravě DNA homologní rekombinaci. (Modrich & Lahue 1996)

2.4. Gen *hMSH6*

Gen *hMSH6* (mutS homolog 6 (*E. coli*)) je lidský homolog genu *mutS* bakterie *Escherichia coli*. Je lokalizován v oblasti 2p16 a skládá se z 10 exonů, které se všechny přepisují do RNA. Jeho cDNA obsahuje 4083 bazí a kóduje 1360 aminokyselin proteinu MSH6. (NCBI Reference Sequence: NG_007111.1, resp. NP_000170.1)

Funkce proteinu MSH6 je popsána výše (viz gen *hMSH2*).

2.5. Cíle práce

Nalézt a případně analyzovat nové zárodečné mutace u MMR genů u pacientu s MTS.

2.6. Metody

Izolace DNA byla provedena z krve komerčně dostupným izolačním kitem na bázi silikátových kolonek dle standardního postupu výrobce. Primery pro PCR amplifikaci byly navrženy tak, aby produkty pokrývaly nejen sekvenci všech kódujících exonů genů *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, ale také případnou mutaci v místech sestřihu. Úspěšně amplifikované produkty byly přečištěny a dále sekvenovány. Analýza sekvenáčnických dat probíhala „in silico“ porovnáním s referenční sekvencí.

2.7. Výsledky

Mutační analýza u studovaného pacienta odhalila bodovou mutaci c.2633T>C / p.V878A v exonu 4 genu *MSH6*. Kromě této mutace byly navíc detekovány dva polymorfismy, c.116C>A / p.G39E v genu *MSH6* a c.655A>G / p.I219V v genu *MLH1*.

Predikční program PolyPhen (= Polymorphism Phenotyping) potvrdil mutační povahu alterace p.V878A.

2.8. Závěr

V této studii pacienta s fenotypickými projevy MTS syndromu byly analyzovány MMR geny způsobující tento syndrom na potenciální přítomnost kauzální mutace. U pacientů s MTS je drtivá většina mutací nalézána v genech *MSH2* a *MLH1*. Gen *MSH6* je alterován velmi vzácně. Dosud byly popsány pouze 3 případy. V této práci byla u 3 pacientů z jedné rodiny nalezena kauzální germinální mutace v genu *MSH6*, čímž se podařilo významně rozšířit skupinu pacientů se syndromem MTS nesoucí alteraci tohoto genu.

2.9. Summary

In this study we have analyzed one patient with Muir–Torre syndrome (MTS) phenotype for causal mutation in mismatch repair (MMR) genes. Most patients with MTS carry mutations in *MSH2* and *MLH1* gene. Germline mutations in *MSH6* are extremely rare, with only 3 cases reported thus far. Here we have described a germline mutation in *MSH6* gene in three members of one family. This greatly extends previously published group of patients with MTS syndrome carrying mutation in *MSH6* gene.

3. Gen *PRKARIA*

3.1. Carneyho komplex (CNC)

Carneyho komplex (Carney complex) je autozomálně dominantní dědičné onemocnění, které je charakterizované mnohočetnými myxomy, kožními a slizničními pigmentovými lézemi a tumory, které mohou postihovat různé orgány a v některých případech vést k endokrinologickým abnormalitám. (*Stratakis et al. 2001*) Více než dvě třetiny případů je familiárních s poměrně nízkým počtem postižených členů rodiny (*DeLillis et al. 2004*). Sporadické případy bývají vzácné. Mezi nejčastěji postižené orgány patří kůže, srdce, varlata, hypofýza a nadledviny (*Stratakis et al. 2001, DeLillis et al. 2004,*

LeBoit et al. 2006). Z genetického hlediska CNC představuje heterogenní onemocnění. Dosud byly identifikovány dva lokusy s kauzálním vztahem k tomuto onemocnění. Prvním z nich je gen *PRKARIA* (také známý pod názvem gen *CNC1*) lokalizovaný na chromosomu 17 a druhým je lokus *CNC2* s dosud blíže nedefinovaným genem ležící na chromosomu 2 (*Casey et al.* 1998).

3.2. Gen *PRKARIA*

Gen *PRKARIA* je lokalizován v oblasti 17q24, skládá se z 12 exonů, přičemž první dva exony nejsou translatovány. Jeho cDNA obsahuje 1146 bází a kóduje 382 aminokyselin, které tvoří regulační podjednotku cAMP-dependentní proteinkinázy A. (*Sandberg et al.* 1987, *Kirschner et al.* 2000)

Inaktivující heterozygotní germinální mutace tohoto genu je nalézána přibližně u 70% pacientů s Carneyho komplexem. (*Bertheart et al.* 2009)

3.3. Cíl práce

- analyzovat gen *PRKARIA* u pacienta s Carneyho syndromem

3.4. Metody

Izolace DNA byla provedena z krve komerčně dostupným izolačním kitem na bázi silikátových kolonek dle standardního postupu výrobce. Primery pro PCR amplifikaci byly navrženy tak, aby produkty pokrývaly nejen sekvenci všech 10 kódujících exonů, ale také případnou mutaci v místech sestřihu. Úspěšně amplifikované produkty byly přečištěny a dále sekvenovány. Analýza sekvenačních dat probíhala „in silico“ porovnáním s referenční sekvencí.

3.5. Výsledky

Mutační analýza u studovaného pacienta odhalila posunovou mutaci c.491_492delTG / p.V164DfsX5 v exonu 6 genu *PRKARIA*. Delece dvou nukleotidů T a G v pozici c.491 a c.492 vedla k posunu čtecího rámce, předčasnému zařazení STOP kodónu vedoucí ke zkrácení funkčního proteinu.

3.6. Závěr

V této práci byl studován pacient s Carneyho komplexem za jehož vznikem, minimálně v 70% případů, stojí alterace genu *PRKARIA*. Námi studovaný pacient spadá do této skupiny, neboť u něho byla nalezena kauzální posunová mutace v exonu 6 v tomto genu.

3.7. Summary

In this study we have investigated patient with Carney complex for a germline mutation of the *PRKARIA* gene. Carney complex patients carry alterations of the *PRKARIA* gene in at least 70% of cases. This studied patient belongs to this group, because a causal frame shift mutation in exon 6 of the *PRKARIA* gene was found in him.

4. Gen *CTNNB1*

4.1. Různé adnexální tumory a gen *CTNNB1*

V této studii bylo analyzováno celkem 89 vzorků různých adnexálních tumorů zahrnující kraniofaryngiom, trichilemmom, trichoblastom, trichoadenom, pilomatrixoma (kalcifikující Malherbeův epitelium), pilomatrikální karcinom, bazocelulární karcinom s matrikální diferenciací, trichofolikulom, bazocelulární karcinom se sebaceózní diferenciací, sebaceózní adenom, sebaceom, sebaceózní karcinom (extraokulární a periokulární forma), trichilemární roh a apokrinní smíšený tumor se stínovitými buňkami.

Molekulární podstata vzniku a vývoje výše zmíněných adnexálních nádorů je komplexní. Jedním z genů, který může být alterován u těchto tumorů a tím přispívat k jejich vzniku a progresi, je gen *CTNNB1*. Mutace v exonu 3 genu *CTNNB1* byly dosud nalezeny v několika kožních adnexálních tumorech. Mezi dosud studované tumory patřily především pilomatrixomy a dále některé kožní nádory s matrikální diferenciací. (*Chan et al.* 1999, *Durand & Molès* 1999, *Lazar et al.* 2005) U ostatních adnexálních kožních tumorů není status genu *CTNNB1* prakticky známý.

4.2. Gen *CTNNB1*

Gen *CTNNB1* (catenin (cadherin-associated protein), beta 1,88kDa) kódující β -katenin je lokalizován na chromosomu 3 v oblasti p22-p21.3. Gen *CTNNB1* se skládá z 16 exonů, přičemž exon 1 není translatován. Jeho cDNA obsahuje 2346 bazí a kóduje 781 aminokyselin. (Nollet *et al* 1996, Kraus *et al.* 1994) β -catenin je multifunkční protein, který se účastní Ca^{2+} závislé mezibuněčné adheze, regulace genové exprese prostřednictvím jeho působení ve Wnt/Wingless signální dráze a také některých dalších buněčných procesů. (McCrea *et al.* 1991)

Mutace genu *CTNNB1* je nalézána u celé řady nádorových onemocnění, včetně některých výše zmíněných adnexálních tumorů. (Doglioni *et al.* 2003)

4.3. Cíl práce

Nalézt případné somatické změny genu *CTNNB1* u vybraných adnexálních nádorů.

4.4. Metody

Izolace DNA byla provedena z parafinových bloků tumorové tkáně komerčně dostupným izolačním kitem na bázi silikátových kolonek dle standardního postupu výrobce. Primery pro PCR amplifikaci exonu 3 genu *CTNNB1* byly navrženy jako dva překrývající se fragmenty, které kromě exonové sekvence zahrnovaly i exon-intronové spoje pro detekci případných mutací v místech sestřihu. Úspěšně amplifikované produkty byly přečištěny a dále sekvenovány. Analýza sekvenačních dat probíhala „in silico“ porovnáním s referenční sekvencí. V případech, kdy byla nalezena mutace, byly vzorky konfirmačně reanalyzovány pomocí již dříve publikovaných primerů.

4.5. Výsledky

Z 89 studovaných vzorků tumorů byla nalezena mutace v exonu 3 genu *CTNNB1* v 8 případech. To zahrnovalo 5 různých bodových mutací s následujícími proteinovými změnami: p.S23N (kribriformní trichoblastom), p.D32Y (pilomatrixom a kraniofaryngom), p.G34R (pilomatrikální karcinom a kraniofaryngom), p.G34V (kraniofaryngom) a p.S37F (2 apokrinní smíšené tumory se stínovitými buňkami). Dva případy apokrinního smíšeného tumoru s mutací p.S37F mikroskopicky vykazovaly dvě odlišné komponenty: cystickou

část se stínovitými buňkami a část konvenční se světlobuněčnou diferenciací. Obě části byly analyzovány odděleně, přičemž mutace p.S37F byla prokázána pouze v cystické části se stínovitými buňkami. Korelace mezi dvojicí starých a nových primerů vykazovala 100%.

4.6. Závěr

V naší studii jsme provedli mutační analýzu části genu *CTNNB1* u 89 kožních adnexálních tumorů. Prokázali jsme, že mutaci tohoto genu nesou hlavně tumory s folikulární diferenciací, zejména pak s matrikální. Kromě toho mohou nést tuto mutaci i vzácné případy trichoblastomů. Naše studie tedy rozšířila spektrum kožních adnexálních tumorů nesoucích alterace v genu *CTNNB1*, vznikajících tak na podkladě aktivace Wnt/wingless signální dráhy.

4.7. Summary

In our study we have performed mutation analysis of part of the *CTNNB1* gene in 89 cutaneous adnexal tumours. We have proven that mutations of this gene are present mainly in tumors with follicular differentiation and mostly with matrical differentiation. Rare examples of trichoblastoma may also harbor this mutation. Our study broadens the spectrum of cutaneous adnexal tumors harboring *CTNNB1* mutations arising from the activation of Wnt/wingless signal pathway.

5. Gen *TP53*

5.1. Maligní tumory vyrůstající na bázi spiradenomů, cylindromů a spiradenocylindromů a gen *TP53*

Spiradenomy, cylindromy a spiradenocylindromy se vyskytují jak sporadicky, tak asociovány s Brookeovým-Spieglerovým syndromem. (Kazakov *et al.* 2012) K malignímu zvratu těchto tumorů dochází velmi vzácně. Pokud se tak stane, tyto tumory obsahují z definice zbytky benigní neoplázie, která, nejčastěji volně, přechází v některou z maligních komponent. Tyto maligní komponenty se mohou vyskytovat buď individuálně, nebo v kombinaci. Tumory samy pak připomínají určité nádory slinných žláz a to

basocelulární adenokarcinom slinných žláz, „high“ nebo „low grade“, invazivní, blíže nespecifikovatelný adenokarcinom a sarkomatoidní metaplastický karcinom. (*Kazakov et al.* 2012, *Biernat & Woźniak* 1996, *Carlsten et al.* 2005, *Antonescu & Terzakis* 1997, *Argenyi et al.* 1992, *Rockerbie et al.* 1989)

Molekulární mechanismy malignizace, těchto jinak benigních tumorů, jsou předmětem výzkumu. Jedním z genů, který se zřejmě může podílet na jejich vzniku a vývoji je *TP53*, jehož overexprese dle některých prací umožňuje odlišení benigní a maligní složky tumoru. (*Biernat & Woźniak* 1996, *Lee & Lee* 1998)

5.2. Gen *TP53*

Tumor-supresorový gen *TP53* (tumor protein p53) je lokalizován v chromosomální oblasti 17p13.1. Kóduje protein p53 o velikosti 393 aminokyselin. (*Benchimol et al.* 1985, *Oren* 1985)

Protein p53 se nachází v jádře a funguje jako účinný transkripční faktor. Za normálních okolností je p53 v buňkách v nízké koncentraci, poločas jeho rozpadu je okolo 20 minut. Při jeho proteolýze hraje důležitou úlohu ubiquitinace. Proteolytická degradace je spouštěna vazbou proteinu Mdm2 na p53, naopak inhibice Mdm2 vede ke stabilizaci p53. (*Momand et al.* 1992)

Aktivace p53 je spouštěna celou řadou stresových situací. Mezi ně patří dvouřetězcové zlomy v DNA a různé typy poškození DNA, které jsou rozpoznávány jednak samotným p53, ale také také specializovanými buněčnými proteiny pro určitý typ poškození DNA, které s p53 komunikují a mohou jej aktivovat. Hladina p53 je dále zvyšována při hypoxii, poklesu hladiny ribonukleosid trifosfátů pod kritickou hodnotu, deregulací důležitých signálních drah (např. dráhy proteinů pRb1, Ras). (*Zhang et al.* 2003, *Osifchin et al.* 1994)

Vzhledem ke klíčové roli proteinu p53 v dějích ovlivňujících proliferaci, apoptózu, reparaci DNA nebo odpověď na stres, není překvapivé, že inaktivace tohoto proteinu je nalézána u celé řady sporadických tumorů. Uvádí se, že až 50% všech nádorů nese mutovaný gen *TP53*. Mutace v tomto genu vedou k narušení rovnováhy výše zmíněných procesů. Většina mutací, které deaktivují p53, způsobují ztrátu schopnosti proteinu vázat se

k jeho cílovým DNA sekvencím, a zabraňují tak transkripční aktivaci příslušných genů. (Soussi 2011)

Vedle sporadických nádorových onemocnění je mutace genu *TP53*, v tomto případě germinální, také asociována s familiárním výskytem Li-Fraumeniho syndromu s autozomálně dominantně přenášenou predispozicí k širokému spektru nádorů, např. sarkomům měkkých tkání a kostí, nádorům prsu, mozkovým nádorům, adrenokortikálním karcinomům a dalším. (Varley *et al.* 1997)

5.3. Metody

Izolace DNA byla provedena z parafinových bloků komerčně dostupným izolačním kitem na bázi silikátových kolonek dle standardního postupu výrobce. Primery pro PCR amplifikaci byly navrženy tak, aby produkty pokrývaly nejen sekvenci všech 10 kódujících exonů, ale také případnou mutaci v místech sestřihu. Úspěšně amplifikované produkty byly přečištěny a dále sekvenovány. Analýza sekvenčních dat probíhala „in silico“ porovnáním s referenční sekvencí.

5.4. Výsledky

Úspěšná PCR amplifikace a sekvenace genu *TP53* byla provedena u 12 z 15 maligně transformovaných, sporadických, či s BSS asociovaných lézí zahrnující cylindromy, spiradenomy a spiradenocylindromy. 3 vzorky nabyly analyzovány z důvodu špatné kvality DNA. Mutace byly zjištěny pouze u jednoho vzorku. Jednalo se o sestřihovou mutaci c.673-1G>A na 3' konci intronu 6 a bodovou mutaci c.743G>A.

5.5. Závěr

V této práci byla provedena analýza mutací genu *TP53* u 12 z 15 maligně transformovaných, sporadických, či s BSS asociovaných lézí zahrnující cylindromy, spiradenomy a spiradenocylindromy. I přes poměrně vysoké procento p53 imunohistochemicky (IHC) pozitivních vzorků, která často naznačuje přítomnost mutace tohoto genu v neoplastických tkáních, byla nalezena mutace genu *TP53* pouze v jednom

vzorku. Tento fakt ukazuje, že mutační analýza *TP53*, narozdíl od IHC, nepřispívá k rozlišení maligních a benigních cylindromů, spiradenomů a spiradenocylindromů.

5.6. Summary

In this study we have performed mutation analysis of TP53 in 12 of 15 malignant transformed, sporadic or BSS associated lesions. Samples included cylindromas, spiradenomas and spiradonecylindromas. Even though high percentage of samples was imunohistochemically (IHC) p53 positive, which often suggests presence of mutation in this gene in neoplastic tissue, only one sample showed mutation in TP53 gene. This shows that as opposed to IHC, mutation analysis of TP53 does not contribute to distinguish malignant cylindromas, spiradenomas and spiradonecylindromas from benign ones.

5.7. Hidradenokarcinom

Hidradenokarcinom kůže je vzácný adnexální tumor reprezentující maligní protějšek hidradenomu. Ačkoli oba sdílejí shodné rysy (variabilní skladbu, „světlobuněčnou“ diferenciaci, mucinózní buňky, skvamoidní buňky a onkocytoidní buňky), hidradenokarcinom vykazuje jak ve své architektuře, tak v cytologických detailech vlastnosti maligního tumoru (asymetrii, infiltrativní růst, intravaskulární invazivitu, nekrózu „en masse“, celulární a jaderný pleomorfismus, přítomnost atypických mitóz). (*Requena et al. 1998, Leobit et al. 2006, Kazakov et al. 2012*)

O molekulární podstatě vzniku a vývoje hidradenokarcinomů kůže existují pouze kusé informace. Translokace t(11;19) (CRTC1/MAML2) byla nalezena asi u 50% případů hidradenomu, benigního analogu hidradenokarcinomu. V dalších, značně raritních, studiích pak byly analyzovány a nalezeny mutace genu *TP53* (*Biernat et al. 1998*) a amplifikace genu *HER2/neu*. (*Nash et al. 2007*)

5.8. Gen *TP53*

Stručná charakteristika genu *TP53* je uvedena v kapitole (5.2.).

5.9. Cíle práce

Nalézt případné somatické změny genu *TP53* u hidradenokarcinomů.

5.10. Metody

Stručný popis použitých metod je uveden v kapitole (5.3.)

5.11. Výsledky

Z celkového počtu 9 studovaných vzorků hidradenokarcinomů byla u 7 vzorků prokázána wild-type sekvence genu *TP53*, u 2 vzorků byla detekována mutace v genu *TP53*. U prvního pozitivního vzorků se jednalo o bodovou mutaci c.818G>A v exonu 8 vedoucí k aminokyselinové záměně argininu za histidin v pozici 273 (p.R273H). U druhého pozitivního vzorku byly prokázány dvě nonsense mutace v exonu 6, jmenovitě c.586C>T a c. 637C>T (p.R196X, resp. p.R213X) vedoucí k zařazení předčasného STOP kodónu.

5.12. Závěr

Stejně jako ve výše zmíněné práci, byla v této studii provedena analýza mutací genu *TP53*. Bylo analyzováno 9 z celkem 14 studovaných kožních hidradenokarcinomů. Mutace byla nalezena ve dvou vzorcích. V jednom p53 IHC pozitivním, v druhém p53 IHC negativním. Obdobně jako v předešlé práci nekoreluje výsledek IHC s mutační analýzou, avšak míra frekvence mutací je obdobná jako u jiných kožních nádorů.

5.13. Summary

As in the above mentioned study mutation analysis of *TP53* gene was performed here in 9 of the total 14 specimens of hidradenocarcinoma studied. *TP53* mutation was found in two samples. One of the samples was imunohistochemicaly (IHC) p53 positive and the other was negative. As in the previous study IHC result does not correlate with mutation analysis however the frequency of the mutations is similar to other cutaneous tumours.

6. Gen *HER2/neu*

6.1. Hidradenokarcinom

viz kapitola 5.7.

6.2. Gen *HER2/neu*

Protoonkogen *HER2/neu* (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)), je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu 17 v oblasti q11.2-q12. Jeho cDNA obsahuje 3678 bází a kóduje 1225 aminokyselin. Produkt genu *HER2/neu* (erbB2) je transmembránový receptor s tyrozin kinázovou aktivitou o hmotnosti 185 kDa, který náleží do rodiny genů HER, homologů EGFR (receptory pro epidermální růstové faktory). (Coussens *et al.* 1985)

Amplifikace genu *HER2/neu* je nalézána u řady nádorových onemocnění (zejména u nádoru prsu a ovaria), včetně některých maligních adnexálních tumorů kůže (např. extramammární Pagetova choroba, hidradenokarcinom). (Nash *et al.* 2007) Amplifikace tohoto genu velice dobře koreluje s overexpresí produktu erbB2 na povrchu buňky (Owens *et al.* 2004) a tím zvýšenou aktivitou receptoru, která má za následek nekontrolovanou proliferaci a angiogenezi.

6.3. Cíle práce

Charakterizovat status genu *HER2/neu* na chromosomální úrovni u hidradenokarcinomů.

6.4. Metody

Detekce amplifikace genu *HER2/neu* byla prováděna pouze u vzorků, které vykazovaly pro *HER2/neu* imunohistochemickou (IHC) pozitivitu 2+ Pro detekci amplifikace byla použita metoda fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH) s využitím komerčně dostupného kitu PathVysion *HER2/neu* DNA probe kit (VYSIS/Abbott). Tento kit využívá směsi dvou různě barevně značených sond. Červené, specifické k sekvenci genu *HER2/neu* a kontrolní, zelené, hybridizující k centromere chromosomu 17 (CEP 17).

Amplifikace genu *HER2/neu* byla pak vyhodnocena jako poměr signálů *HER2/neu* ku CEP 17 v 60 náhodně vybraných, nepřekrývajících se jádrech nádorové tkáně, vyhodnocené dvěma, an sobě nezávislými odečitateli. Jako hranice positivity byla použita hodnota poměru $\geq 2,0$.

6.5. Výsledky

Imunohistochemické vyšetření pro *HER2/neu* bylo provedeno u 8 vzorků hidradenokarcinomů. 5 vzorků bylo negativních (skóre 0 nebo 1+). 3 vzorky (ze dvou případů) vykazovaly IHC 2+ pozitivitu pro *HER2/neu*. U těchto vzorků byla následně provedena FISH analýza, která ani u jednoho vzorku neprokázala amplifikaci genu *HER2/neu*.

6.6. Závěr

Ve studii kožních hidradenokarcinomů, byla vedle dalších vyšetření provedena IHC analýza proteinu c-erbB2 (*HER2*) u 8 vzorků 5 pacientů. V případě hraničních výsledků (IHC 2+), která byla nalezena u 3 vzorků, byla provedena FISH. U žádného nebyla nalezena amplifikace genu *HER2/neu*. Tato alterace podle naší studie tedy významně nepřispívá ke vzniku a vývoji kožních hidradenokarcinomů.

6.7. Summary

In a study of cutaneous hidradenocarcinoma IHC analysis for c-erbB2 (*HER2*) protein was performed in 8 specimens from 5 cases. Three specimens which showed borderline results (IHC 2+) were all subsequently proved negative for *Her2/neu* gene amplification by FISH. According to our study this alteration doesn't contribute to the origin and progress of cutaneous hidradenocarcinoma.

7. Geny *CRTC1* a *MAML2*, translokace t(11;19)(*CRTC1*/*MAML2*)

7.1. Hidradenokarcinom

viz kapitola 5.7.

7.2. Geny *CRTC1* a *MAML2*, translokace t(11;19)(*CRTC1*/*MAML2*)

Při translokaci t(11;19)(*CRTC1*/*MAML2*) dochází ke zlomu v intronu 1 genu *CRTC1* (CREB regulated transcription coactivator) (též *MECT1*, *TORC1* a *WAMPT1*), jenž je lokalizován na chromosomu 19 a v intronu 1 genu *MAML2* (Mastermind-like 2), který leží na chromosomu 11. Tento zlom vede ke vzniku fúzního genu, jenž se skládá z exonu 1 genu *MECT1* a exonů 2 až 5 genu *MAML2*. (*Behboudi et al.* 2006)

Protein kódovaný genem *CRTC1* náleží do rodiny vysoce konzervovaných CREB (cAMP response element-binding) koaktivátorů. *CRTC1* zvyšuje transkripci z CRE (cAMP response element) prostřednictvím interakce s bZIP (bazický leucinový zip) doménou CREB. (*Stenman* 2005)

Produkt genu *MAML2* je transkripční koaktivátor v Notch signální dráze. Protein *MAML2* tvoří komplex s intracelulární doménou proteinu Notch a s proteiny CSL-rodiny transkripčních faktorů. Tato interakce vede k aktivaci Notch downstream genů jako např. *HES1* a *HES5*. (*Katoh & Katoh* 2007)

U fúzního proteinu *CRTC1*/*MAML2* je nahrazena N-terminální bazická doména genu *MAML2* CREB-binding doménou genu *CRTC1*. Molekulární konsekvence této záměny nejsou dosud zcela objasněné, ale z dosavadních zjištění vyplývá, že fúzní protein nezávisle na vstupních signálech aktivuje jak CREB závislé geny, tak i Notch signální dráhu. Aktivace dvou nezávislých drah pak zřejmě významně přispívá k vlastnímu neoplastickému procesu. (*Fehr et al.* 2008)

Translokace t(11;19) (q21;p13) je typickým znakem mukoepidermálního karcinomu, jednoho z nejčastěji se vyskytujících maligních nádorů slinných žláz. Vedle toho byl produkt této fúze nalezen i ve Warthinových tumorech (*Enlund et al.* 2004, *Miyamoto et al.* 2010) a dále pak v kožních hidradenomech. (*Nash et al.* 2007)

7.3. Cíle práce

Nalézt případnou přítomnost translokace t(11;19) u hidradenokarcinomů.

7.4. Metody

Izolace RNA byla provedena z formalínem fixovaných, v parafínu zalitých tkání komerčně dostupným izolačním kitem na bázi silikátových kolonek dle standardního postupu výrobce s následnou syntézou cDNA. Ke kontrole kvality extrahované RNA byla použita PCR amplifikace 105 bp fragmentu transkriptu genu kódujícího β 2-mikroglobulinu a 126 bp fragmentu transkriptu genu kódujícího PBGD. Pro další analýzu byly vybrány pouze ty vzorky, které byly pozitivní na oba kontrolní testované geny. Pomocí RT-PCR byl detekován fúzní produkt (transkript) CRTC1/MAML2 o velikosti 120-bp, který byl následně ověřován sekvenováním.

7.5. Výsledky

Pro analýzu translokace t(11;19)(CRTC1/MAML2) bylo ve studii hidradenokarcinomů vybráno 8 vzorků ze 7 případů. U dvou vzorků byla prokázána přítomnost translokace CRTC1/MAML2, ostatní vzorky byly negativní. U vzorku jedna byla translokace prokázána jak v iniciálním, tak rekurentním tumoru.

7.6. Závěr

Ve studii kožních hidradenokarcinomů byla též analyzována přítomnost translokace t(11;19), která je charakteristickým znakem části hidradenomů a která dosud u hidradenokarcinomů nebyla studována. Tato translokace byla u hidradenokarcinomů nalezena v 14% případů, což naznačuje, že minimálně část těchto tumorů vzniká a progreduje v důsledku této chromosomální přestavby.

7.7. Summary

Presence of translocation t(11;19), a characteristic sign for a part of hidradenomas was analyzed for the first time in the study of cutaneous hidradenocarcinomas. This translocation was found in 14% of cases of hidradenocarcinomas, which suggests that at

least some part of this group of tumours originates and progresses as a result of this chromosomal rearrangement.

8. Seznam použité literatury

1. Amaro C, Freitas I, Lamarão P, Afonso A, Skrzypczak M, Heinritz W. Multiple trichoepitheliomas--a novel mutation in the CYLD gene. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(7):844-6.
2. Antonescu CR, Terzakis JA. Multiple malignant cylindromas of skin in association with basal cell adenocarcinoma with adenoid cystic features of minor salivary gland. *J Cutan Pathol*. 1997;24(7):449-53.
3. Argenyi ZB, Nguyen AV, Balogh K, Sears JK, Whitaker DC. Malignant eccrine spiradenoma. A clinicopathologic study. *Am J Dermatopathol*. 1992 Oct;14(5):381-90.
4. Arnold A, Payne S, Fisher S, Fricker D, Soloway J, White SM, Novelli M, MacDonald K, Mackay J, Groves R, Canham N. An individual with Muir-Torre syndrome found to have a pathogenic MSH6 gene mutation. *Fam Cancer*. 2007;6(3):317-21.
5. Behboudi A, Enlund F, Winnes M, Andrén Y, Nordkvist A, Leivo I, Flaberg E, Szekely L, Mäkitie A, Grenman R, Mark J, Stenman G. Molecular classification of mucoepidermoid carcinomas-prognostic significance of the MECT1-MAML2 fusion oncogene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(5):470-81.
6. Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA, Peacock J. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet*. 1985;11(5):505-10.
7. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2085-2091.
8. Biernat W, Peraud A, Wozniak L, Ohgaki H. p53 mutations in sweat gland carcinomas. *Int J Cancer*. 1998;76(3):317-20.
9. Biernat W, Woźniak L. p53 expression in sweat gland tumors. *Pol J Pathol*. 1996;47(1):3-6.
10. Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, Green H, Brown C, Biggs PJ, Lakhani SR, Jones C, Hansen J, Blair E, Hofmann B, Siebert R, Turner G,

- Evans DG, Schrandt-Stumpel C, Beemer FA, van Den Ouweland A, Halley D, Delpech B, Cleveland MG, Leigh I, Leisti J, Rasmussen S. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet.* 2000;25(2):160-5.
11. Blake PW, Toro JR. Update of cylindromatosis gene (CYLD) mutations in Brooke-Spiegler syndrome: novel insights into the role of deubiquitination in cell signaling. *Hum Mutat.* 2009;30(7):1025-36. Review.
 12. Carlsten JR, Lewis MD, Saddler K, Reilly P, Pan T, Gnepp DR, Robinson-Bostom L. Spiradenocylindrocarcinoma: a malignant hybrid tumor. *J Cutan Pathol.* 2005;32(2):166-71.
 13. Casey M, Mah C, Merliss AD, Kirschner LS, Taymans SE, Denio AE, Korf B, Irvine AD, Hughes A, Carney JA, Stratakis CA, Basson CT. Identification of a novel genetic locus for familial cardiac myxomas and Carney complex. *Circulation.* 1998;98(23):2560-6.
 14. Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E. A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet.* 1999;21(4):410-3
 15. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985;230(4730):1132-9.
 16. DeLillis RA, Llood RV, Heitz PU, Eng CE. World Health Organization of Tumours. Pathology and Genetic of Tumours of Endocrine organs. Lyon: IARC Press; 2004.
 17. Doglioni C, Piccinin S, Demontis S, Cangi MG, Pecciarini L, Chiarelli C, Armellini M, Vukosavljevic T, Boiocchi M, Maestro R. Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol.* 2003;163(6):2277-87.
 18. Durand M, Molès JP. [Beta-catenin mutations in a common skin cancer: pilomatricoma]. *Bull Cancer.* 1999;86(9):725-6.
 19. Dzantiev L, Constantin N, Genschel J, Iyer RR, Burgers PM, Modrich P. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol Cell.* 2004;15(1):31-41.
 20. Enlund F, Behboudi A, Andrén Y, Oberg C, Lendahl U, Mark J, Stenman G. Altered Notch signaling resulting from expression of a WAMTP1-MAML2 gene fusion in

- mucoepidermoid carcinomas and benign Warthin's tumors. *Exp Cell Res.* 2004; 292(1):21-8.
21. Fehr A, Röser K, Heidorn K, Hallas C, Löning T, Bullerdiek J. A new type of MAML2 fusion in mucoepidermoid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47(3):203-6.
 22. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(7-8):391-407. Review.
 23. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-63. Review.
 24. Katoh M, Katoh M. Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *Int J Oncol.* 2007 ;31(2):461-6.
 25. Kazakov DV, Michal M, Kacerovska D, McKee PH. Cutaneous adnexal tumors. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, 2012.
 26. Kazakov DV, Schaller J, Vanecek T, Kacerovska D, Michal M. Brooke-Spiegler syndrome: report of a case with a novel mutation in the CYLD gene and different types of somatic mutations in benign and malignant tumors. *J Cutan Pathol.* 2010;37(8):886-90.
 27. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159-70. Review.
 28. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lin JP, Carney JA, Stratakis CA. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet.* 2000;9(20):3037-46.
 29. Knudson AG, Jr. Introduction to the genetics of primary renal tumors in children. *Med Pediatr Oncol.* 1993;21(3):193-8.
 30. Kraus C, Liehr T, Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics.* 1994;23(1):272-4.
 31. Lazar AJ, Calonje E, Grayson W, Dei Tos AP, Mihm MC Jr, Redston M, McKee PH. Pilomatrix carcinomas contain mutations in CTNNB1, the gene encoding beta-catenin. *J Cutan Pathol.* 2005;32(2):148-57.
 32. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin AE. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press: Lyon 2006. 2006.

33. Lee HH, Lee KG. Malignant eccrine spiradenoma with florid squamous differentiation. *J Korean Med Sci.* 1998;13(2):191-5
34. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon, France: IARC Press; 2006.
35. Leonard N, Chaggar R, Jones C, Takahashi M, Nikitopoulou A, Lakhani SR. Loss of heterozygosity at cylindromatosis gene locus, CYLD, in sporadic skin adnexal tumours. *J Clin Pathol.* 2001;54(9):689-92.
36. Li GM. The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncol Res.* 1999;11(9):393-400. Review.
37. Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet.* 1993;5(3):279-82.
38. Mangold E, Rahner N, Friedrichs N, Buettner R, Pagenstecher C, Aretz S, Friedl W, Ruzicka T, Propping P, Rütten A, Kruse R. MSH6 mutation in Muir-Torre syndrome: could this be a rare finding? *Br J Dermatol.* 2007;156: 158–162.
39. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7621-36. Review.
40. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science.* 1991;254(5036):1359-61.
41. Mercader P. Muir-Torre syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2010;685:186-95. Review.
42. Miyamoto A, Akasaka K, Oikawa H, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Immunohistochemical study of HER2 and TUBB3 proteins in extramammary Paget disease. *Am J Dermatopathol.* 2010;32(6):578-85.
43. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:101-33. Review.
44. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992;69(7):1237-45.
45. Muir EG, Bell AJ, Barlow KA. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with kerato-acanthomata of the face. *Br J Surg.* 1967;54:191–195.

46. Murphy HR, Armstrong R, Cairns D, Greenhalgh KL. Muir-Torre Syndrome: expanding the genotype and phenotype--a further family with a MSH6 mutation. *Fam Cancer*. 2008;7(3):255-7.
47. Nash JW, Barrett TL, Kies M, Ross MI, Sneige N, Diwan AH, Lazar AJ. Metastatic hidradenocarcinoma with demonstration of Her-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization: potential treatment implications. *J Cutan Pathol*. 2007;34(1):49-54.
48. Nasti S, Pastorino L, Bruno W, Gargiulo S, Battistuzzi L, Zavattaro E, Leigheb G, De Francesco V, Tulli A, Mari F, Scarrà GB, Ghiorzo P. Five novel germline function-impairing mutations of CYLD in Italian patients with multiple cylindromas. *Clin Genet*. 2009;76(5):481-5.
49. Nollet F, Berx G, Molemans F, van Roy F. Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics*. 1996;32(3):413-24.
50. Oren M. The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta*. 1985;823(1):67-78. Review.
51. Osifchin NE, Jiang D, Ohtani-Fujita N, Fujita T, Carroza M, Kim SJ, Sakai T, Robbins PD. Identification of a p53 binding site in the human retinoblastoma susceptibility gene promoter. *J Biol Chem*. 1994;269(9):6383-9.
52. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer*. 2004;5(1):63-9.
53. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):810-2.
54. Requena L, Kiryu H, Ackerman AB. *Neoplasms With Apocrine Differentiation*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1998.
55. Rockerbie N, Solomon AR, Woo TY, Beals TF, Ellis CN. Malignant dermal cylindroma in a patient with multiple dermal cylindromas, trichoepitheliomas, and bilateral dermal analogue tumors of the parotid gland. *Am J Dermatopathol*. 1989 Aug;11(4):353-9.
56. Sandberg M, Taskén K, Oyen O, Hansson V, Jahnsen T. Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for a type I regulatory subunit of cAMP-

- dependent protein kinase from human testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;149(3):939-45.
57. Schmutte C, Sadoff MM, Shim KS, Acharya S, Fishel R. The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease I. *J Biol Chem.* 2001;276(35):33011-8.
58. Scholz IM, Nümann A, Froster UG, Helmbold P, Enk AH, Näher H. New mutation in the CYLD gene within a family with Brooke-Spiegler syndrome. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010;8(2):99-101.
59. Sima R, Vanecek T, Kacerovska D, et al. Brooke-Spiegler syndrome: report of 10 patients from 8 families with novel germline mutations: evidence of diverse somatic mutations in the same patient regardless of tumor type. *Diagn Mol Pathol.* 2010;19(2):83-91.
60. Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Adv Cancer Res.* 2011;110:107-39. Review.
61. Stenman G. Fusion oncogenes and tumor type specificity--insights from salivary gland tumors. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(3):224-35. Review.
62. Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4041-6. Review.
63. Torre D. Multiple Sebaceous tumors. *Arch Dermatol.* 1968;98:549-551.
64. Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br J Cancer.* 1997;76(1):1-14. Review.
65. Vogelstein B, Kinzler KW. Tumour-suppressor genes. X-rays strike p53 again. *Nature.* 1994;370(6486):174-5.
66. Wang FX, Yang LJ, Li M, Zhang SL, Zhu XH. A novel missense mutation of CYLD gene in a Chinese family with multiple familial trichoepithelioma. *Arch Dermatol Res.* 2010;302(1):67-70.
67. Zhang XJ, Liang YH, He PP, Yang S, Wang HY, Chen JJ, Yuan WT, Xu SJ, Cui Y, Huang W. Identification of the cylindromatosis tumor-suppressor gene responsible for multiple familial trichoepithelioma. *J Invest Dermatol.* 2004 Mar;122(3):658-64.
68. Zhang Y, Wolf GW, Bhat K, Jin A, Allio T, Burkhart WA, Xiong Y. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol.* 2003.

9. Příloha

9.1. Souhrn publikací týkajících se tématu práce – „Genetické změny adnexálních nádorů kůže“, na kterých autor participoval

1. **Grossmann P**, Vanecek T Steiner P, Kacerovska D, MD, Spagnolo DV, Cribier B, Rose Ch, Vazmitel M, Carlson JA, Emberger M, Martinek P, Pearce RL, Pearn J, Michal M, Kazakov, DV. **Novel and recurrent germline and somatic mutations in a cohort of 67 patients from 48 families with Brooke-Spiegler syndrome including the phenotypic variant of multiple familial trichoepitheliomas and correlation with the histopathological findings in 379 biopsy specimens.** Am J Dermatopathol. 2012; *In press*.
2. Kacerovska D, Cerna K, Martinek P, **Grossmann P**, Michal M, Ricar J, Kazakov DV. **MSH6 mutation in a family affected by Muir-Torre syndrome.** Am J Dermatopathol. 2012; *In press*.
3. Kacerovska D, Requena L, Michal M, **Grossmann P**, Treskova I, Roucka P, Kazakov DV. **Spectrum of cutaneous and soft tissue lesions in two Carney complex patients - adnexal induction versus authentic adnexal neoplasms.** Am J Dermatopathol. 2012; *In press*.
4. Kacerovská D, Michal M, Síma R, **Grossmann P**, Kazakov DV. [Carney complex].Cesk Patol. 2011;47(4):192-7. Review.
5. Kazakov DV, **Grossmann P**, Spagnolo DV, Vanecek T, Vazmitel M, Kacerovska D,Zelger B, Calonje E, Michal M. **Expression of p53 and TP53 mutational analysis in malignant neoplasms arising in preexisting spiradenoma, cylindroma, andspiradenocylindroma, sporadic or associated with Brooke-Spiegler syndrome.** Am J Dermatopathol. 2010;32(3):215-21.
6. Kazakov DV, Thoma-Uszynski S, Vanecek T, Kacerovska D, **Grossmann P**, Michal M.A case of Brooke-Spiegler syndrome with a novel germline deep intronic mutationin the CYLD gene leading to intronic exonization, diverse somatic mutations, and unusual histology. Am J Dermatopathol. 2009;31(7):664-73.

7. Kazakov DV, Sima R, Vanecek T, Kutzner H, Palmedo G, Kacerovska D, **Grossmann P**, Michal M. **Mutations in exon 3 of the CTNNB1 gene (beta-catenin gene) in cutaneous adnexal tumors.** Am J Dermatopathol. 2009;31(3):248-55.
8. Kazakov DV, Ivan D, Kutzner H, Spagnolo DV, **Grossmann P**, Vanecek T, Sima R, Kacerovska D, Shelekhova KV, Denisjuk N, Hillen U, Kuroda N, Mukensnabl P, Danis D, Michal M. **Cutaneous hidradenocarcinoma: a clinicopathological, immunohistochemical, and molecular biologic study of 14 cases, including Her2/neu gene expression/amplification, TP53 gene mutation analysis, and t(11;19) translocation.** Am J Dermatopathol. 2009;31(3):236-47.
9. Kazakov DV, Zelger B, Rütten A, Vazmitel M, Spagnolo DV, Kacerovska D, Vanecek T, **Grossmann P**, Sima R, Grayson W, Calonje E, Koren J, Mukensnabl P, Danis D, Michal M. **Morphologic diversity of malignant neoplasms arising in preexisting spiradenoma, cylindroma, and spiradenocylindroma based on the study of 24 cases, sporadic or occurring in the setting of Brooke-Spiegler syndrome.** Am J Surg Pathol. 2009;33(5):705-19.

9.2. Souhrn dalších publikací autora dizertační práce

1. Nagashima Y, Furuya M, Gotohda H, Takagi S, Hes O, Michal M, **Grossmann P**, Tanaka R, Nakatani Y, Kuroda N. **FLCN gene-mutated renal cell neoplasms: Mother and daughter cases with a novel germline mutation.** Int J Urol. 2011. [Epub ahead of print]
2. Krenova Z, Kren L, Blatny J, Falk M, Kazakov DV, **Grossmann P**, Shimada H, Sterba J. **Extraosseal Ewing sarcoma as a rare cause of the blueberry muffin baby syndrome: a case report and the review of the literature.** Am J Dermatopathol. 2011;33(7):733-5.
3. Wolfe A, Dobin SM, **Grossmann P**, Michal M, Donner LR. **Clonal trisomies 7,10 and 12, normal 3p and absence of VHL gene mutation in a clear cell tubulopapillary carcinoma of the kidney.** Virchows Arch. 2011;459(4):457-63.
4. Petersson F, SÍma R, **Grossmann P**, Michal M, Kuroda N, Hora M, Yang X, Kinkor Z, Trivunic S, Zalud R, Sperga M, Jaunmuktane Z, Branžovský J, Ferda J,

- Hes O. **Renal small cell oncocytoma with pseudorosettes A histomorphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 10 cases.** Hum Pathol. 2011; 42(11):1751-60
5. Krejci J, Pesek M, **Grossmann P**, Krejci M, Ricar J, Benesova L, Minarik M. **Extraordinary response to erlotinib therapy in a patient with lung adenocarcinoma exhibiting KRAS mutation and EGFR amplification.** Cancer Genomics Proteomics. 2011;8(3):135-8.
 6. Hes O, Vaněček T, Petersson F, **Grossmann P**, Hora M, Perez Montiel DM, Steiner P, Dvořák M, Michal M. **Mutational analysis (c.402C>G) of the FOXL2 gene and immunohistochemical expression of the FOXL2 protein in testicular adult type granulosa cell tumors and incompletely differentiated sex cord stromal tumors.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2011;19(4):347-51.
 7. Daum O, Zalud R, **Grossmann P**, Mukensnabl P, Michal M. **A case of imatinib-naive ileal fibrous stromal tumor with unusual morphology and double PDGFRA mutation.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2010;18(5):484-5.
 8. Daum O, Jirasek T, **Grossmann P**, Mukensnabl P, Michal M. **Plexiform fibroma of the colon.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2010;18(5):483-4.
 9. Daum O, Hatlova J, Mandys V, **Grossmann P**, Mukensnabl P, Benes Z, Michal M. **Comparison of morphological, immunohistochemical, and molecular genetic features of inflammatory fibroid polyps (Vanek's tumors).** Virchows Arch. 2010;456(5):491-7.
 10. Petersson F, **Grossmann P**, Vanecek T, Coric M, Cacic M, Hes O, Michal M. **Testicular germ cell tumor composed of placental site trophoblastic tumor and teratoma.** Hum Pathol. 2010;41(7):1046-50.
 11. Petersson F, Gatalica Z, **Grossmann P**, Perez Montiel MD, Alvarado Cabrero I, Bulimbasic S, Swatek A, Straka L, Tichy T, Hora M, Kuroda N, Legendre B, Michal M, Hes O. **Sporadic hybrid oncocytic/chromophobe tumor of the kidney: a clinicopathologic, histomorphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular cytogenetic study of 14 cases.** Virchows Arch. 2010 Apr;456(4):355-65.

12. Petersson F, Michal M, **Grossmann P**, Franco M, Zámečník M, Hes O. **Low-grade sarcoma in classical seminoma - the first case reported.** Int J Clin Exp Pathol. 2009;3(2):203-9.
13. Daum O, Ferdova E, Kural T, **Grossmann P**, Nemcova J, Mukensnabl P, Michal M. **Pancreatic undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells masquerading as (extra)gastrointestinal stromal tumor: potential diagnostic pitfall.** Pathol Int. 2010;60(1):59-61.
14. Melichar B, Laco J, Slováček L, **Grossmann P**, Vanecek T. **Fatal venous thrombembolism complicating imatinib therapy in a patient with metastatic gastrointestinal stromal tumor.** J Exp Clin Cancer Res. 2006;25(4):607-10.
15. Daum O, **Grossmann P**, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M. **Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors.** Ann Diagn Pathol. 2007;11(1):27-33.
16. Hes O, Vanecek T, Síma R, Hora M, Velickinová H, **Grossmann P**, Kovár J, Michal M. **Tumorous diseases in patients with the testicular feminization syndrome ("androgen insensitivity" syndrome) -description of two cases.** Ceska Gynekol. 2005;70(2):113-7.