

**Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.**

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Biologie

Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Petr Šteiner

**Molekulárně genetická charakterizace vzácných nádorů urogenitálního traktu**

**Molecular genetic characterization of the rare tumours of the urogenital tract**

Diplomová práce

**Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Tomáš Vaněček, Ph.D.**

**Praha 2011**

**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, 29. 08. 2011

Podpis

**Poděkování:**

Děkuji RNDr. Tomáši Vaněčkovi, Ph.D. za cenné připomínky a rady při vypracovávání diplomové práce, Prof. MUDr. Ondřeji Hesovi, Ph.D. za odborné konzultace, Ing. Stanislavu Kormundovi za pomoc při statistickém zpracování dat a kolektivu laboratoří Bioptická s.r.o. za laborantskou technickou pomoc.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2010 – 2011 v rámci grantového projektu **MSM 0021620819**, Náhrada a podpora funkce některých životně důležitých orgánů.

## Abstrakt

Předmětem této práce byly molekulárně genetické charakteristiky čtyř typů nádorů ledvin (papilární renální karcinomy [PRK], tubulocystické renální karcinomy [TRK], pseudorozetový renální karcinom [PRRK] a neklasifikovatelné renální karcinomy [NRK]) a dvou typů nádorů testes (testikulární adultní typ nádoru buněk z granulózy [ATGCT] a inkompletně diferenciované „sex cord“ gonadální stromální tumory [ISCST]).

V případě TRK byla studována aktivita signálních drah účastnících se angiogeneze s cílem posoudit vhodnost použití antiangiogenních terapeutik k léčbě TRK. Expres klíčových genů těchto drah byla analyzována na úrovni mRNA pomocí Real-Time RT PCR. U TRK a PRK byl studován metylační profil 24 tumor supresorových genů s cílem posoudit příbuznost těchto nádorů. Případně nalezené rozdíly by bylo možno použít v diferenciální diagnostice. U PRRK a NRK byly detekovány chromozomální aberace pomocí array-CGH s cílem nalézt specifické aberace využitelné opět v diferenciální diagnostice. Dále byla ověřována specifita mutace genu *FOXL2* c.402C>G pro ovariální ATGCT studiem výskytu této mutace u testikulárních ATGCT a ISCST.

Naměřené hladiny mRNA u TRK ukazují, že u žádné ze zkoumaných signálních drah nebyla zvýšená aktivita. Klastrová analýza ukázala podobnost metylačních profilů TRK a PRK. Pomocí array-CGH byly u PRRK a NRK odhaleny unikátní, dříve nepopsané kombinace chromozomálních aberací. Mutace genu *FOXL2* c.402C>G nebyla u našich testikulárních ATGCT a ISCST nalezena.

**Klíčová slova:** aneuploidie, angiogeneze, *FOXL2*, léčba, papilární karcinom, ovárium, karcinom tvořící pseudorozety, tubulocystický karcinom, ledvina.

## **Abstract**

The aim of this study was molecular characterization of four types of renal tumours (papillary renal cell carcinoma [PRCC], tubulocystic renal carcinoma [TCRC], pseudorosette forming renal carcinoma [PRRC] and unclassified renal carcinomas [URC]) and two types of rare tumours of the testes (Adult type of granulosa cell tumours [ATGCTs] and Incompletely differentiated sex cord stromal tumours [ISCSTs]).

In case of TCRC the activity of signalling pathways involved in angiogenesis was studied. The aim was to determine the suitability of antiangiogenic agents for treatment of TCRC. Next, the methylation profile of 24 tumor suppressor genes was studied in TCRC and PRCC in order to analyze their similarity. Eventual differences could be helpful tool in differential diagnostics. Also, spectrum of chromosomal aberrations was analyzed by array-CGH in one case of PRRC and two cases of URC. Any unique aberration found would be useful in differential diagnostics of these tumors. Last, but not least, the specificity of mutation c.402C>G of *FOXL2* gene for ovarian ATGCTs was verified by studying its occurrence in testicular ATGCTs and ISCSTs.

Analysis of mRNA levels did not reveal any enhanced activity of the studied signalling pathways. Cluster analysis of methylation profiles showed close relationship between PRCC a TCRC. Array-CGH revealed unique (to date unknown) spectrums of aberrations in PRRC and URC. Mutation *FOXL2* c.402C>G wasn't found in our series of testicular ATGCTs and ISCSTs.

**Keywords:** Aneuploidy, angiogenesis, *FOXL2*, kidney, papillary carcinoma, ovarian, rosette forming, tubulocystic carcinoma, treatment.

## Obsah

1	Seznam zkratk	11
2	Úvod	20
3	Přehled literatury	22
3.1	Renální karcinomy a jejich vybrané typy	22
3.1.1	Základní charakteristika běžných typů renálních karcinomů	23
3.1.2	Světlobuněčný renální karcinom	23
3.1.3	Papilární renální karcinom	25
3.1.4	Chromofobocelulární renální karcinom	26
3.1.5	Renální onkocytom	27
3.1.6	Tumory s přestavbami Xp11.2	28
3.1.7	Pseudorozetový karcinom - t(6;11)(p21;q12)	30
3.1.8	Collecting duct carcinoma (Karcinom ze sběrných duktů)	31
3.1.9	Tubulocystický karcinom ledviny	32
3.2	Angiogeneze u renálních karcinomů	34
3.3	Studované geny v expresi TRK	36
3.3.1	PTEN	36
3.3.2	PI3K/Akt pathway	36
3.3.3	mTOR	36
3.3.4	VHL	37
3.3.5	HIF	37
3.3.6	VEGFA	38
3.3.7	PDGFA	39
3.3.8	bFGF	39
3.3.9	EGF	39
3.3.10	EGFR	39
3.3.11	FLT1	39

3.3.12	KDR .....	40
3.3.13	H-Ras .....	40
3.3.14	Fos + Jun .....	40
3.3.15	p53.....	40
3.3.16	MT1-MMP .....	41
3.3.17	E-Kadherin .....	41
3.3.18	Beta-atenin .....	41
3.3.19	NF-κB.....	42
3.3.20	NOS3.....	43
3.4	Metylace u renálních karcinomů .....	43
3.5	Léčba renálních karcinomů .....	44
3.5.1	Sunitinib .....	47
3.5.2	Sorafenib .....	47
3.5.3	Pazopanib .....	47
3.5.4	Bevacizumab .....	48
3.5.5	Everolimus .....	48
3.5.6	Temsirolimus .....	49
3.6	Vzácné nádory genitálního traktu.....	49
3.6.1	Ovariální adultní typ nádoru buněk z granulózy.....	49
3.6.2	Testikulární adultní typ nádoru buněk z granulózy.....	50
3.6.3	Inkompletně diferenciované sex cord gonadální stromální tumory.....	51
3.6.4	Gen <i>FOXL2</i> .....	52
4	Materiál a metody .....	54
4.1	Materiál pro analýzu hladin vybraných mRNA genů u TRK.....	54
4.2	Materiál pro metylační analýzu u TRK a PRK .....	54
4.3	Materiál pro aCGH analýzu chr. aberací u vzácných RK .....	55
4.4	Materiál pro detekci <i>FOXL2</i> mutace u genitálních tumorů.....	55



4.4.1	ATGCT .....	55
4.4.2	ISCST .....	56
4.5	Analýza exprese vybraných genů pomocí Real-Time RT PCR .....	56
4.5.1	Výběr genů pro analýzu Real-Time RT PCR .....	56
4.5.2	Odparafinování tkáňových bloků .....	57
4.5.3	Izolace RNA .....	57
4.5.4	Reverzní transkripce .....	58
4.5.5	Kontrola kvality cDNA .....	59
4.5.6	Real-Time RT PCR .....	61
4.5.7	Statistické zpracování dat .....	62
4.6	Analýza metylace .....	64
4.6.1	Izolace DNA .....	64
4.6.2	PCR (kontrolní geny po izolaci DNA) .....	64
4.6.3	Metylační analýza .....	66
4.7	Array-CGH analýza .....	68
4.7.1	Izolace DNA a PCR kontrolních genů .....	68
4.7.2	Princip a postup metody aCGH .....	68
4.7.3	LOH .....	70
4.7.4	FISH .....	71
4.8	Analýza genu <i>FOXL2</i> .....	72
4.8.1	Izolace DNA a PCR kontrolní geny .....	72
4.8.2	Amplifikace .....	72
4.8.3	Čištění PCR reakce .....	73
4.8.4	Sekvenační reakce .....	73
4.8.5	Přečištění sekvenační reakce .....	74
4.8.6	Kapilární elektroforéza .....	74
5	Výsledky .....	75

5.1	Exprese TRK .....	75
5.2	Metylace .....	79
5.3	Detekce chromozomálních aberací pomocí aCGH .....	80
5.3.1	Případ A .....	80
5.3.2	Případ B a C .....	82
5.4	Detekce <i>FOXL2</i> mutace c.402C>G.....	83
6	Diskuze.....	85
6.1	Exprese TRK .....	85
6.1.1	PI3K/Akt/mTOR dráha .....	85
6.1.2	RTK/MAPK dráha .....	85
6.1.3	p53.....	87
6.1.4	NF-κB a CTNNB1 .....	88
6.1.5	MT1-MMP a HIF-2α .....	88
6.2	Metylace .....	89
6.2.1	RASSF1A.....	89
6.2.2	RUNX3 .....	90
6.2.3	IGF2 .....	91
6.3	Array-CGH.....	93
6.3.1	Případ A .....	93
6.3.2	Případ B a C .....	94
6.4	Detekce <i>FOXL2</i> mutace c.402C>G.....	95
7	Souhrn .....	96
8	Seznam citované literatury .....	97

## 1 Seznam zkratek

113-1	Antimitochondriální protilátka	Využití v imunohistochemii
aCGH	Array comparative genomic hybridization	Metoda k určení chromozomálních aberrací
AE1-AE3	Protilátka proti cytokeratinům	Využití v imunohistochemii
Akt (PKB)	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog	Serin/proteinové kinázy 1, 2 a 3
Alpha (MALAT1)	Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1	Gen fúzující s TFEB, upregulován v nemalobuněčném karcinomu plic
ALT	Alaninaminotransferáza	Enzym vyšetřovaný v krvi
AP-1	Activator Protein 1	Transkripční faktor složený z FOS a JUN
ASPL	Alveolar Soft Part Sarcoma	Gen fúzující s TFE3
AST	Aspartátaminotransferáza	Enzym vyšetřovatelný v krvi
ATGCTs	Adult Type of Granulosa Cell Tumours	Adultní typ nádoru buněk z granulózy
BAD	Bcl2 antagonist of cell death	Antiapoptotický gen
Bcl2	B-Cell CLL/Lymphoma 2	Proapoptotický gen
bFGF (FGF2)	Basic fibroblast growth factor	Fibroblastový růstový faktor

CAM 5.2	Anti-Cytokeratin	Využití v imunohistochemii
CD10 (CALLA)	Common Acute Lymphocytic Antigen	Antigen pro detekci akutní lymfoblastické leukemie využití v imunohistochemii
CDH1	Cadherin 1	Gen pro E-Cadherin
CK	Cytokeratins	Cytokeratiny (obvykle mají upřesňující číselné označení) využití v imunohistochemii
CLTC	Clathrin, heavy chain polypeptide	Gen pro těžký řetězec klathrinu, fúzuje s TFE3
MET	MET protooncogene	Onkogen
CTCF	CCCTC-binding factor	Transkripční faktor
CTNNB1	Catenin, beta-1	Protein pro adhezi mezi buňkami, signální protein
ECM	Extracelular matrix	Extracelulární hmota
EGF	Epidermal growth factor	Růstový faktor epitelálních buněk
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor pro EGF
EMA	Epitelial membrane antigen	Detekce metastáz, využití v imunohistochemii
ERK <sup>1/2</sup>	Extracelular signal related kinases	Intracelulární signální molekuly MAPK dráhy
Fas	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	Apoptotický ligand endotelových buněk
FasR	Fas Receptor	Receptor pro ligand Fas
FGFR	Fibroblast growth factor receptor	Receptor pro FGF

FHIT	Fragile Histidine Triad gene	Jeden z fúzujících genů u světlobuněčného renálního karcinomu
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization	Fluorescenční in situ hybridizace
FKBP12	The 12-kDa FK506 Binding Protein	12kDa FK506 vazebný protein (fyziologický regulátor buněčného cyklu)
Flt-1 (VEGFR1)	FMS-Related Tyrosin kinase 1	Tyrozín kinázový receptor pro VEGF
FLT3	FMS-Related Tyrosin kinase 3	Tyrozín kinázový receptor pro růstové faktory
FOS	V-FOS FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog	Onkogen, složka transkripčního faktoru AP-1
FOXL2	Winged/helix Forkhead Transcription Factor	Transkripční faktor v ovariální diferenciaci
GTPase switch	Guaninriphosphate switch proteins	Proteiny měnící GTP za GDP
H19	H19 gene	Gen H19 exprimovaný fyziologicky z maternální alely
hARD-1	human N-Alpha-Acetyltransferase 10	Protein acetylující N-konce proteinů
HE	Hematoxylin-eosin	Barvení hematoxylin-eosin pro běžné biopsie
HER-2	V-ERB-B2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog2	Tyrozín-kinázový receptor často Gen amplifikovaný u nádorů prsu

HIF-1 $\alpha$	Hypoxia inducible faktor 1, subunit $\alpha$	Transkripční faktor 1 indukovaný hypoxií buněk, podjednotka $\alpha$
HIF-2 $\alpha$	Hypoxia inducible faktor 2, subunit $\alpha$	Transkripční faktor 2 indukovaný hypoxií buněk, podjednotka $\alpha$
HIF- $\beta$	Hypoxia inducible factor, subunit $\beta$	Transkripční faktor indukovaný hypoxií buněk, podjednotka $\beta$
HMB45	Human Melanoma Black	Protilátka proti melanomům využití v imunohistochemii
HRE	Hypoxia response element	Element v promotoru některých genů pro geny aktivované hypoxií
CHRK	Chromofocelulární renální karcinom	Typ nádorů ledvin
IC1	Imprinting Control Region 1	Regulační oblast mezi geny IGF2 a H19
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$	Interferon- $\alpha$ , využití k terapii nádorů
IGF2	Insulin-like growth factor II	Insulinu podobný růstový faktor 2
IGFR-1	Insulin-like growth factor 1 receptor	Receptor pro insulinu podobný růstový faktor
IL-2	Interleukin 2	Interleukin 2, využití pro léčbu nádorů
IL-8	Interleukin 8	Interleukin 8, růstový faktor

ISCSTs	Incompletely differentiated sex-cord stromal tumours	Inkompletně diferenciované sex-cord gonadální stromální tumory
I-κB	NF-κB inhibitor	Inhibitor pro NF-κB (maskuje jeho jaderný lokalizační signál)
JUN	V-JUN Avian Sarcoma virus 17 oncogene homolog	Onkogen JUN, složka transkripčního faktoru AP-1
CTSK	Kathepsin-K	Využití v imunohistochemii
KDR (VEGFR2)	Kinas Insetr Domain Receptor	Tyrozín-kinázový receptor pro VEGF
KIT	V-KIT HARDY-ZUCKERMAN 4 FELINE Sarcoma Viral Oncogene Homolog	Onkogen KIT, inhibován sunitinibem
LOH	Loss of heterozygosity	Ztráta heterozygoty, zde především ve významu metody
MAPK1	Mitogen Activated Protein Kinase 1	Protein Kináza Aktivovaná Mitogenem
MDM-2	Mouse Double Minute 2 Homolog	Onkoprotein MDM2, inhibitor p53
Melan-A (MART-1)	Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1	Antigen, využití v imunohistochemii, především na melanomy
MIB-1	MIB-1 antibody	Protilátka proti proliferacionímu markeru Ki-67

MIC-2 (CD99)	Single Chain Type 1 Glycoprotein?	Imunohistochemický marker Ewingova sarkomu
MiTF	Microphthalmia-Associated Transcription Factor	Transkripční faktor, kontroluje produkci melaninu
MMP	Matrix MetalloProteinase	MMPs, rozrušují ECM
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center	Prognostický systém pro renální karcinomy
MT1-MMP (MMP14)	Membrane type 1 matrix metalloproteinase	Transmembránová Matrix Metaloproteáza, Upstream efektor matrix metaloproteáz
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin	Serin/Treoninová protein kináza regulující řadu buněčných procesů. Existují u ní dva podobné komplexy (mTORC1 a mTORC2)
NF-κB	Nuclear Factor of Kappa Light Chain Gene Enhancer in B Cells 1	Transkripční faktor enhancerů genů lehkých řetězců v B buňkách
NonO	Non-Pou Domain-Containing Octamer-Binding Protein	Jeden z genů fúzujících s TFE3
NOS3	Nitric Oxid Synthase 3	Gen syntézy oxidu dusičného
p27 (KIP1)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B	Inhibitor buněčného cyklu
p50	p50	Podjednotka NF-κB



P504S (AMACR)	$\alpha$ -methylacyl coenzyme A racemase	Využití v imunohistochemii (např. rakovina prostaty)
p65	p65	Podjednotka NF- $\kappa$ B
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	Růstový faktor odvozený od destiček (má izoformy A a B)
PDGFR- $\beta$	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta	Receptor pro PDGF
PDLIM	PDZ and Lim Domain Protein 4	PDZ a Lim doménový protein 4, tumor supresor
PEBP2/CBF	Polyomavirus-enhancer Binding Protein/Core Binding Factor	Transkripční faktor kódovaný genem RUNX3.
PI3K	Phosphatidylinositol 3- kinase	Fosfatidylinositol 3 kináza, enzym signální transdukce
PRCC	Papillary Renal Cell Carcinoma Translocation- Associated gene	Gen asociovaný s translokací u PRK, fúzní partner TFE3
PRK	Papilární Renální Karcinom	Podtyp renálního karcinomu
PSF (GINS 1-4)	GINS complex subunits 1-4	Gen fúzující s TFE3, iniciátor replikace DNA
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog	Tumor supresor, reprimuje mTOR dráhu
Raf (C-Raf, B-Raf)	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homologs	Onkogeny homologické virovým onkogenům

Ras	V-HA-Ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog	Homologní onkogeny K-Ras, H-Ras a N-Ras
RASSF	Ras Association Domain Family Proteins	Proteiny asociované s Ras doménou (podtypy 1-6)
RK	Renální karcinomy	Obecné označení nádorů ledvin
RO	Renální Onkocytom	Typ nádoru ledvin
RTK	Receptor tyrosin kinase	Tyrozín kinázové receptory
RUNX	Runt-Related Transcription Factor	Homologní transkripční faktory RUNX1 – RUNX3
S-100	S-100 Calcium-Binding Protein	Ca <sup>2+</sup> vazebné proteiny (např. kalmodulin, troponin C), využití v imunohistochemii
SDF1 (CXCL12)	Stromal Cell-Derived Factor 1	Člen chemokinové rodiny aktivující leukocyty
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Použití při izolaci RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Jednonukleotidový polymorfismus
SOCS1	Suppressor Of Cytokine Signaling 1	Člen rodiny proteinů inhibujících JAK-STAT signální dráhu
SRK	Světlobuněčný renální karcinom	Nejběžnější typ buněčného renálního karcinomu
TFE3	Transcription Factor For Immunoglobulin Heavy Chain Enhancer 3	Hlavní fúzní partner v Xp11.2 translokačních renálních karcinomech

TFEB	T-Cell Transcription Factor EB	Hlavní fúzní partner u pseudorozetových karcinomů
TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor Alpha	Indukuje vývoj epiteliálním směrem
TGF- $\beta$ /Smad	TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway	Signální dráha (růst, diferenciacce, apoptóza)
TIMPs	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase	Inhibitory metaloproteináz
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor	Zánětlivý cytokin
TP53	Tumor Protein p53	Gen pro tumor supresorový protein p53
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand	Ligand indukující apoptózu závislý na TNF
TRC8	Ring Finger Protein 139 (Translocation in Renal Carcinoma on Chromosome 8)	E3 ubiquitin ligáza endoplazmatického retikula
TRK	Tubulocystický renální karcinom	Studovaný typ vzácného renálního karcinomu
Tsp-1	Thrombospondin-1	Efektor p53 pro inhibici angiogeneze
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Vaskulární růstový faktor endotelových buněk
VHL	Von Hippel-Lindau Gen	E3-ubiquitin ligázový gen
VIM	Vimentin	Další z cytkeratinů, využití v imunohistochemii
YY1	Yin Yang 1	Transkripční faktor

## 2 Úvod

Cílem diplomové práce byla aplikace moderních molekulárně genetických metodik za účelem detailnější charakterizace vybraných typů tumorů s ohledem na možnosti jejich cílené diferenciací diagnostiky a léčby. Jednalo se o některé vzácné typy tumorů urogenitálního traktu.

V první a hlavní části mé diplomové práce jsem se zabýval angiogenezi tubulocystických renálních karcinomů. U renálních karcinomů, které jsou větší než 2mm, se začíná objevovat angiogeneze z důvodu nedostatečného zásobení rakovinných buněk kyslíkem, čímž by hrozilo odumírání nádoru. V hypoxických buňkách dojde ke stabilizaci HIF-1 (hypoxia inducible factor), který zahajuje kaskádu dějů vedoucích ke zvýšení exprese VEGF( vascular endothelial growth factor) a mnoha dalších genů tvořících začátek dráhy zajišťující tvorbu nových cév. Mnoho genů zodpovědných za tvorbu cév je známo. Na tvorbu nových cév je dnes zacíleno několik léků (např. sunitinib) a další jsou ve vývoji. K léčbě TRK byl sunitinib poprvé použit v roce 2008, přičemž stav pacienta se vždy při každém cyklu léčby zlepšoval a pět měsíců po terapii měl jen mírné projevy nemoci (MEGO et al. 2008). Vzhledem k tomu, že sunitinib a některé další léky jsou RTK inhibitory, které brání především tvorbě cév, zajímalo mě, jakou má TRK tendenci tvořit cévy pomocí detekce exprese 24 vybraných genů zahrnutých v angiogenních drahách s cílem odvození vhodnosti použití antiangiogenních terapeutik k léčbě TRK.

Bylo spekulováno, že TRK mohou tvořit podtyp PRK, vzhledem k tomu, že se oba typy vyskytují ve společném ložisku. Zajímalo mne, jak se TRK liší od PRK v metylačním profilu 24 tumor-supresorových genů. Cílem bylo přispět k porovnání jejich příbuznosti. Zároveň jsem tím jako první identifikoval, které z těchto genů jsou u TRK metylovány.

V další části diplomové práce jsem se zabýval stanovením karyotypů některých vzorků pomocí aCGH. Hagenkord et al. (2008) stanovoval karyotyp pomocí SNP arraye mimo jiné i u vzorků, které byly diagnostikovány jako neklasifikované RK a podařilo se mu tímto způsobem objasnit 91% těchto případů. Stanovení karyotypu by tedy mohlo velmi pomoci při stanovení diagnózy obtížných případů. Měl jsem k dispozici dva vzorky neklasifikovatelných renálních karcinomů a jeden vzorek renálního karcinomu tvořícího pseudorozety a zajímalo mne, jestli je na základě analýzy

aCGH bude možné zařadit k běžným typům RK nebo zda budou tvořit samostatné entity. Výsledky neidentifikovatelných aCGH jsem potvrdil analýzou FISH na parafinových blocích a výsledek pseudorozetového RK jsem potvrdil analýzou LOH s příslušnými markery. Výsledky analýzy pseudorozetového karcinomu se staly součástí publikace přijaté v časopise Human Pathology s impakt faktorem 2,961.

V poslední části mé práce jsem se zabýval mutací *FOXL2* (c.402C>G), která byla nalezena v 94,6% případů u tumorů z buněk granulózy dospělého typu a thecomů v 12,5%, ale ne v několika dalších typech ovariálních tumorů (KIM et al. 2010). Zajímalo mne, zda se tato mutace vyskytuje v testikulárních tumorech z granulózy dospělého typu (ATGCT) a v neúplně diferencovaných sex cord stromálních tumorech (ISCST), což by mohlo pomoci v diferenciální diagnostice těchto tumorů. Tato analýza se stala součástí publikace publikované v časopise Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology s impakt faktorem 1,709.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Renální karcinomy a jejich vybrané typy

Incidence rakoviny stoupá, což by se mimo jiné mohlo připsat pokroku v zobrazovacích technikách, které jsou schopny odhalit menší ložiska než dříve. Většina těchto nádorů je diagnostikována při rutinních prohlídkách z jiné indikace, např.: kardiovaskulárních onemocnění, hepatobiliárních onemocnění nebo při skenování celého těla (BRETHERAU et al. 1995). RK se vyskytují v každém věku, ale s nejvyšší incidencí u lidí kolem 50. - 70. roku věku (PFEIFER 2006). Muže a ženy postihuje v poměru 3:2 (FERLAY et al. 2010). Nejvyšší incidence je ve východní a západní Evropě, Skandinávii, Itálii, Severní Americe, Austrálii a na Novém Zélandu. Toto geografické rozdělení naznačuje, že incidence je spojena s rizikovými environmentálními faktory (BALDEWIJNS et al. 2008).

V České republice je výskyt RK vyšší než v ostatních zemích, s největším výskytem v Plzeňském a Jihočeském kraji a naopak nejnižším výskytem v Libereckém a Ústeckém kraji. Incidence onemocnění je v ČR také vyšší u mužů než u žen. V roce 2004 tvořily RK 4,5% všech malignit, což v absolutních číslech je asi 1275-1480 nových případů ročně u mužů a 850-950 nových případů ročně u žen. Úmrtnost v ČR je asi 700 mužů a 450 žen

([http://www.uzis.cz/download.php?ctg=20&search\\_name=novotvar&region=100&kind=21&mnu\\_id=6200](http://www.uzis.cz/download.php?ctg=20&search_name=novotvar&region=100&kind=21&mnu_id=6200)).

Za klasické příznaky RK je považována hematurie, objevit bolesti zad, hmatná rezistence, a ztráta hmotnosti. Může se objevit také bolest z míst metastáz či přidruženého paraneoplastického syndromu. Mnoho RK se diagnostikuje náhodně jako bezpříznakové, při pitvě nebo při hledání příčin nesouvisejících zdravotních potíží (např. hypertenzi, bolesti břicha, poruchami trávení, respiračních potížích, atd.) (TAKAHASHI et al. 2006, MACLENNAN et al. 1997).

Renální karcinomy tvoří heterogenní skupinu malignit. Vznikají v 80% z parenchymu ledvin (karcinomy z renálních buněk), zbytek pochází z pánvičky, přičemž prakticky všechny nádory pocházející z parenchymu mají charakter adenokarcinomu a nádory z pánvičky jsou z přechodného epitelu (např. TRK) (CHOW et al. 1999).

### **3.1.1 Základní charakteristika běžných typů renálních karcinomů**

Mezi běžné typy renálních epiteliálních nádorů se řadí světlobuněčný renální karcinom vznikající z proximálních tubulů (HALBERT et al. 2006), který má 2x častější incidenci u mužů než u žen. Dále papilární renální karcinom vznikající z proximálních tubulů s 5-8x častějším výskytem u mužů. Dále chromofobocelulární renální karcinom (CHRK), který vzniká z vmezeřených buněk dolního nefronu a renální onkocytom (RO), který je však zcela benigní s 2,5 častějším výskytem u žen než u mužů. Předpokládá se, že RO vzniká stejně jako CHRK z vmezeřených buněk dolního nefronu (<http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/RenalCellCarcinID5021.html>).

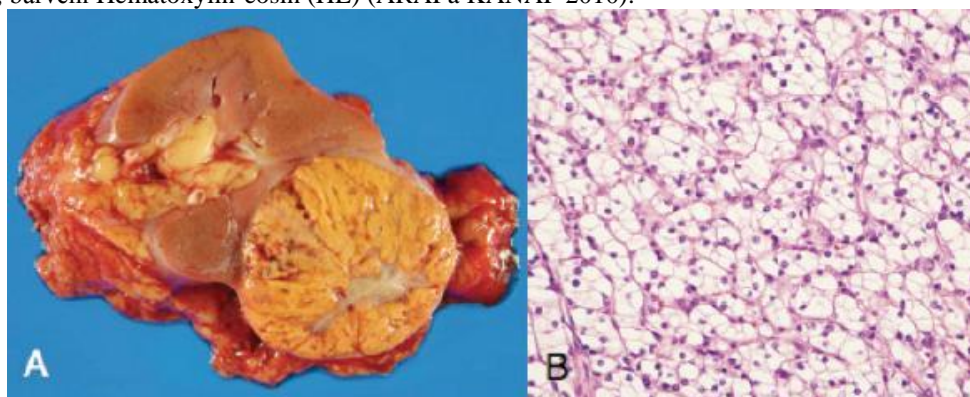
### **3.1.2 Světlobuněčný renální karcinom**

SRK (viz obrázek 1) tvoří 70% všech buněčných nádorů ledvin dospělého věku. Multicentrický, popř. bilaterální SRK tvoří asi jen 5% sporadických karcinomů, ale jsou běžným jevem u dědičných forem (PFEIFER 2006). Průměrný věk pacientů při diagnóze je 62 let (MICHAL et al. 2000).

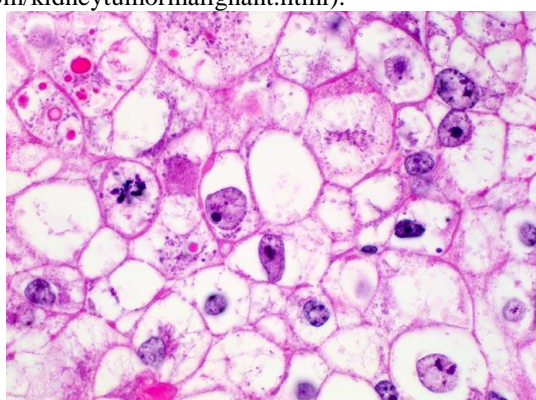
Průměrná velikost tumoru je do 4,6cm. SRK se může, stejně jako všechny ostatní RK diferencovat do sarkomatoidního RK. Většinou vzniká v tubulech kůry ledvin, někdy může být většina tumoru uložena extrarenálně. Tumor bývá dobře ohraničen od zdravé ledviny pseudokapsulou. Makroskopicky je tumor solidní, hrbolatý na povrchu, na povrchu bílý až zlatavě žlutý (pro vysoký obsah glykogenu) s četnými nekrotizacemi a hemorhagickými ložisky. Tumor bývá často kalcifikován (MICHAL et al. 2000).

Mikroskopicky má SRK solidní tubulární vzhled s četnými kapilárami. Lipidy obsažené v cytoplazmě se rozpustí při zpracování tkáně a cytoplazma tak působí světlým dojmem. Ve stroma tumoru bývají přítomny pěníte makrofágy, krystaly cholesterolu (avšak méně často než u PRK), hemosiderin, někdy i metaplastická chrupavka či kost. Tumor i jeho metastázy často obsahují sklovité hyalinní globule (viz obrázek 2), které často slouží právě k identifikování původu u metastáz (HES et al. 1998).

**Obrázek 1:** Světlobuněčný renální karcinom. A: makroskopický pohled, B: mikroskopický pohled, barvení Hematoxylin-eosin (HE) (ARAI a KANAI 2010).



**Obrázek 2:** SRK s intracytoplazmatickými hyalinními globulemi, barvení HE (<http://pathologyoutlines.com/kidneytumormalignant.html>).



Imunohistochemické vyšetření SRK nebývá vždy 100% průkazné vzhledem k občasným pozitivitám s protilátkami identifikujícími jiné tumory (MICHAL et al. 2000).

Typickým molekulárně genetickým znakem SRK jsou různé mutace (delece) *VHL* genu lokalizovaného na lokusu 3p25. Somatická *VHL* mutace se vyskytuje u 60% sporadických RK (HES, osobní sdělení). Rodiny, které mají von-Hippel-Lindau syndrom, patří mezi rizikové skupiny pro rozvoj SRK. Rodiny, které mají charakteristické přestavby chromozomu 3, se také řadí do této rizikové skupiny. Mezi takové přestavby mohou patřit např. translokace  $t(3;8)(p14;q24)$ , při kterých fúzuje gen *FHIT* s genem *TRC8* a SRK se tak může rozvíjet i při zachování nepoškozeného *VHL* (PFEIFER 2006).

Charakteristickou chromozomální aberací u SRK je ztráta 3p21-25 nebo většího úseku. Dalšími aberacemi mohou být trisomie chromozomu 5 nebo jeho dlouhého raménka, trisomie 7, dále monosomie 14q a 9q (HAGENKORD et al. 2008). Dále byly



pozorovány strukturní přestavby 5q22, delece 6q, 8p, 9p21-22, 14q, monosomie chromozomu 9 (STEINER a SIDRANSKY 1996), trisomie chromozomu 12 a 20 a monosomie chromozomů 8 a 13q a strukturní abnormality dlouhých ramének chromozomu 10

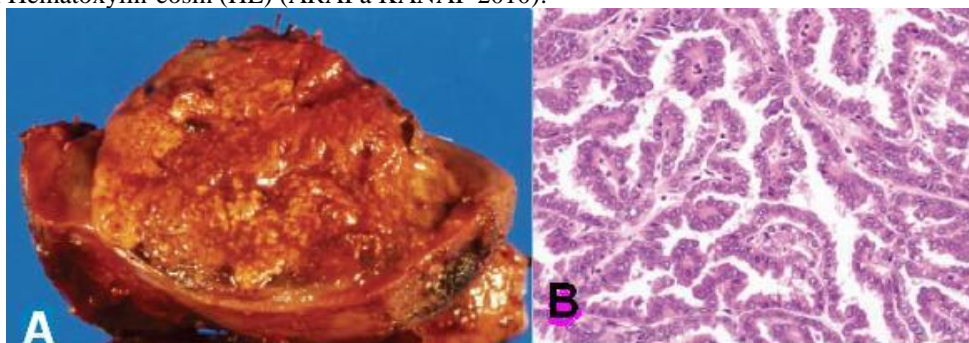
(<http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/RenalCellCarcinID5021.html>).

### 3.1.3 Papilární renální karcinom

PRK (viz obrázek 3) tvoří 10% buněčných nádorů ledvin (PFEIFER 2006). Byl popsán až v roce 1976. Je to nejčastější varianta renálních karcinomů u lidí do 30 let (MICHAL et al. 2000). Vznikají obvykle v kůře ledvin, mají světle šedou až zlatavě žlutou barvu (závisející na obsahu pěníných makrofágů, který bývá velmi vysoký), častá je přítomnost hemorhagie a nepřítomnost cév (MICHAL et al. 2000).

Morfologicky lze PRK rozdělit na dva typy. Typ 1 s malými epiteliálními buňkami s neobjemnou cytoplazmou, uspořádanými v jedné vrstvě a typ 2, kde mají epiteliální buňky cytoplazmy nadbytek a tvoří pseudostratifikovaný epitel (PFEIFER 2006). PRK bývají často spojeny s výskytem mnohočetných bilaterálních papilárních adenomů. U pacientů s PRK je možné v kůře ledviny pozorovat kortikální papilární tumory, které jsou pravděpodobně premaligní lézí posléze se vyvíjející do PRK. U jader PRK se často vyskytují podlouhlé jaderné zářezy. Často lze pozorovat mikroskopická ložiska nekróz. Vzácně lze nalézt PRK, které svým vzhledem připomínají renální onkocytom (LEFÉVRE et al. 2005, HES et al. 2006).

**Obrázek 3:** Papilární renální buněčný karcinom. A: makroskopický pohled, B: mikroskopický pohled barvení Hematoxylin-eosin (HE) (ARAI a KANAI 2010).



Imunohistochemicky lze očekávat pozitivitu s protilátkami proti cytokeratinům a vimentinu (HES et al. 2006).

Dědičný PRK je autosomálně dominantní s missense mutacemi v *MET* proto-onkogenu lokalizovaném na 7q31. Tato mutace se též objevuje u 13% sporadických případů (PFEIFER 2006). Mezi nejčastější chromozomální aberace patří trisomie chromozomů 7, 17 a ztráta chromozomu Y u mužů (KOVACS et al. 1991), které se dnes využívají pro diferenciální diagnostiku (EBLE et al. 2004). U maligních PRK se s menší četností vyskytovaly trisomie chromozomů 12, 16 a 20 (KOVACS et al. 1991) a trisomie chromozomu 3, popř. jeho dlouhého raménka (HAGENKORD et al. 2008).

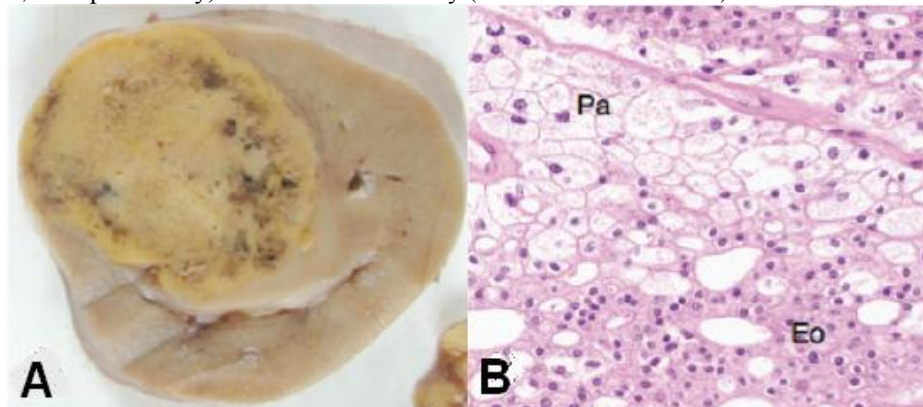
#### **3.1.4 Chromofobocelulární renální karcinom**

CHRK (viz obrázek 4) tvoří 5% buněčných nádorů ledvin.

Makroskopicky je tumor dobře ohraničený, má homogenní šedou nebo hnědou barvu. Nekróza ani hemorhagie nebývá přítomna. Průměrná velikost tumoru při nefrektomii je 8,5cm. CHRK a RO mohou vznikat z renálních tubulů. CHRK obvykle nemetastázuje, ale mohou se diferencovat do vysoce maligních sarkomatoidních RK (ve 3,5% případů). Tyto pak často infiltrují okolní orgány, rozvíjí se u nich ložiska nekroz a hemorhagie (MICHAL et al. 2000).

Morfologicky jde o buňky s vysokým objemem cytoplazmy a zřetelnými hranicemi mezi buňkami a se slabou barvitelností (PFEIFER 2006), takže tumor vypadá mozaikovitě. Buňky mívají obvykle větší počet srašťelých jader s perinukleárním projasněním. Pro sarkomatoidní karcinom vzniklý z CHRK jsou charakteristická ložiska s drobnými ostrůvky dobře diferencovaného CHRK, které jsou obklopené vřetenobuněčným sarkomatoidním karcinomem (MICHAL et al. 2000). Elektronová mikroskopie nezřídka odhaluje intracytoplazmatické vezikuly v apikálních částech buněk (LATHAM et al. 1999).

**Obrázek 4:** Chromofobocelulární renální karcinom. A: makroskopický pohled, B: mikroskopický pohled barvení HE, Pa = pale buňky, Eo= eozinofilní buňky (ARAI a KANAI 2010).



Imunohistochemicky je CHRK pozitivní na cytokeratiny (hlavně s CAM 5.2) a EMA, negativní s AE1-AE3 (MICHAL et al. 2000).

Jeho nejčastějšími chromozomálními aberacemi jsou monosomie chromozomů 1, 2, 6, 10, 13, 17 a 21 (KOVACS a KOVACS 1992).

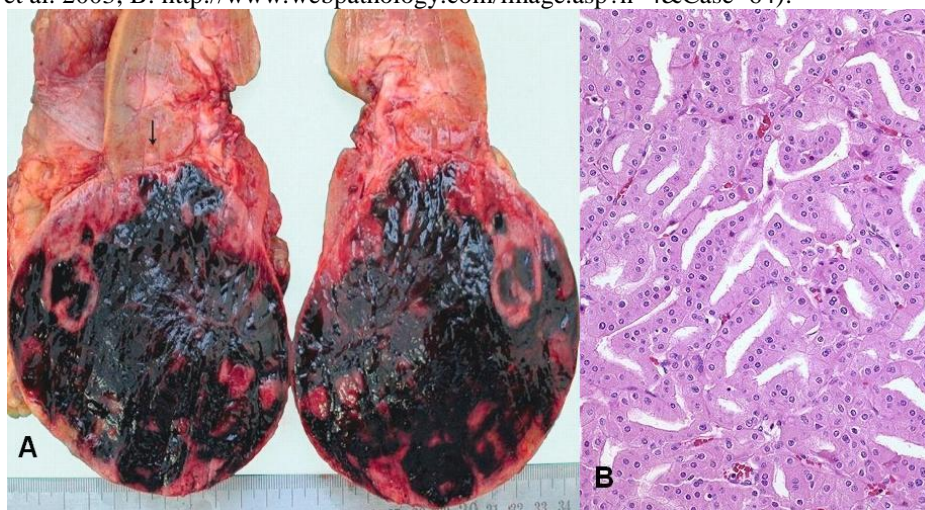
### 3.1.5 Renální onkocytom

Renální onkocytom (viz obrázek 5) může při histologickém vyšetření připomínat eozinofilní variantu CHRK, někdy i SRK či PRK 2. typu (PANER et al. 2007). Je vždy benigní. Průměrný věk pacientů je 70let (MICHAL et al. 2000).

Makroskopicky je RO dobře ohraničený, má mahagonově-hnědou barvu, u větších tumorů se vyskytuje centrální jizva. Tumor má v průměru 3,5cm, přičemž může dosáhnout maximální velikosti až 20cm. Může se vyskytovat společně s dalšími typy renálních tumorů (MICHAL et al. 2000).

Histologicky mají buňky RO velké množství eozinofilní cytoplazmy a velké množství mitochondrií. Mohou růst solidně, acilárně, nebo mikrocysticky. Vzácně se u nich vyskytují pěníte makrofágy. Buňky RO někdy mívají dvě jádra, která jsou malá, oválná a s jemným chromatinem (MICHAL et al. 2000).

**Obrázek 5:** Renální onkocytom. A: makroskopický pohled, B: mikroskopický pohled barvení HE (A: PILLAY et al. 2003; B: <http://www.webpathology.com/image.asp?n=4&Case=64>).



Imunohistochemicky se RO prokazují reakcí s proliferačním markerem MIB-1 (TICKOO et al. 1998) a antimitochondriální protilátkou 113-1 (TICKOO et al. 1997).

Onkocytom má asi v polovině případů normální karyotyp. Častými chromozomálními změnami jsou ztráty chromozomu 1 nebo jeho částí (PANER et al. 2007), ztráta chromozomu Y nebo naopak trisomie chromozomů 1 a 12 (BROWN et al. 1996, STEINER a SIDRANSKY 1996), monosomie chromozomu 14 a přestavby 11q. (FÜZESI et. al. 2005) Vzácně se může vyskytnout i trisomie 5q, 5p, 7, 14q, 14, 18 a 20 (HAGENKORD et al. 2008).

### 3.1.6 Tumory s přestavbami Xp11.2

Xp11.2 translokační renální karcinomy (viz obrázek 6) tvoří nově popsanou jednotku, která byla zařazena do poslední WHO klasifikace (EBLE et al. 2004).

Tyto tumory zasahují převážně děti a mladé dospělé. Analýzou 443 pacientů s RK bylo pomocí cytologické a imunohistochemické analýzy (pozitivita pro TFE3) zjištěno, že 7 z nich (1,6%) mělo Xp11.2 translokační RK, ačkoliv všechny byly původně chybně diagnostikovány jako SRK nebo PRK. Z 26 pacientů majících RK ve věku mladším než 45 let, měli 4 z nich tento typ tumoru (KOMAI et al. 2009).

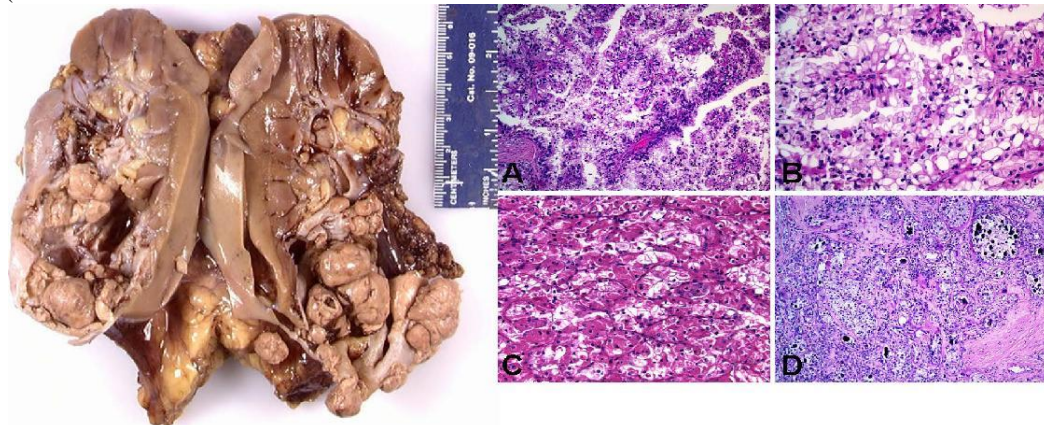
Nejčastějším příznakem těchto nádorů je hematurie. Dříve se myslelo, vzhledem k léčebné historii některých pozorovaných pacientů, že rizikovým faktorem pro vznik tumoru by mohla být předešlá chemoterapie (HUANG et al. 2008).

Tyto tumory se velmi často podobají SRK. Jsou jakýmsi křížencem mezi alveolárním sarkomem měkkých tkání (alveolar soft part sarcoma) a RK (HES, osobní

sdělení). Na pohled jsou žlutavé a obvykle s nekrotickými nebo hemorhagickými ložisky. Jejich typickým znakem jsou papilární struktury tvořené světlými buňkami, nebo ložisková architektura tvořená buňkami s eozinofilní granulární cytoplazmou. Každý podtyp Xp11.2 translokačního tumoru vykazuje jiné morfologické znaky, které jsou souvztažné jejich fúzním partnerům (HUANG et al. 2008).

Imunohistochemicky jsou pozitivní na renální marker CD10 a negativní na vimentin, EMA a cytokeratiny (HUANG et al. 2008). Základem pro jejich diagnostiku je přísně jaderná pozitivita s protilátkou proti TFE3 (MALOUF et al. 2010).

**Obrázek 6:** Xp11.2 translokační karcinom ledviny. Vlevo: makroskopický snímek, vpravo mikroskopické snímky. A, Papilární složka s vmezeřenými objemnými světlými a eozinofilními buňkami. B, Papilární složka s objemnými světlými buňkami. C, Vnořená/alveolární složka s vmezeřenými eozinofilními/onkocytickými buňkami. D, Nahodilé hyalinní noduly a početné „psammoma bodies“ (ARMAH et al. 2009).



Tyto tumory jsou charakteristické přestavbami *TFE3*, který se nachází v lokusu Xp11.2. Zatím bylo popsáno 5 fúzních partnerů v těchto tumorech a to *ASPL*, *PRCC*, *PSF*, *NonO* a *CLTC*. Nejčastěji se jedná o balancované translokace, v jednom případě jde o inverzi (PFEIFER 2006).

Léčebné možnosti jsou v současné době velmi omezené, vzhledem k jejich rezistenci k radioterapii, chemoterapii a imunoterapii (na imunoterapii odpovídá 11-20% pacientů), především na vyoperování tumoru. Klinicky bývají agresivnější než SRK, v čase diagnózy jsou u většiny pacientů metastázy v přilehlých uzlinách (HUANG et al. 2008).

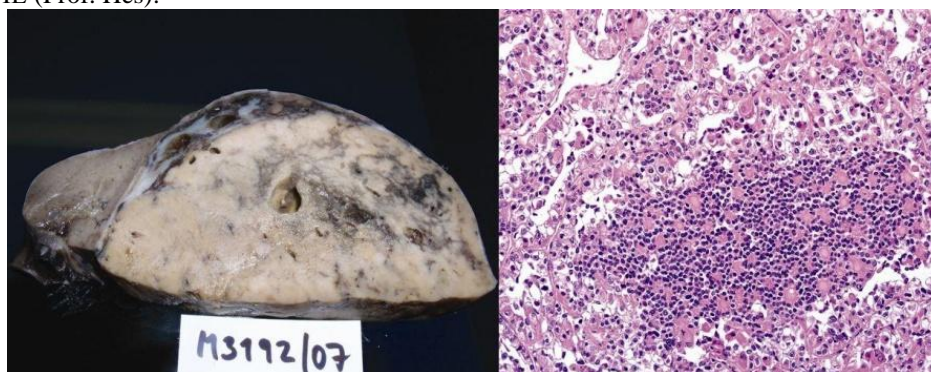
### 3.1.7 Pseudorozetový karcinom - t(6;11)(p21;q12)

Tento tumor je charakteristický translokací zahrnující *TFEB* gen. *TFEB* je homolog *TFE3* genu, který je součástí Xp11.2 translokačních tumorů (HUANG et al. 2008).

Makroskopicky je tumor dobře ohraničený, nodulární, na povrchu hnědý, s menšími ložisky nodulů žluté barvy (ARGANI et al. 2001).

Mikroskopicky je tento tumor obklopen tenkou ložiskově kalcifikovanou fibrózní kapsulí, kterou tumor prostupuje na více místech. Tumor je tvořen shluky dobře ohraničených polygonálních epitelioidních buněk, které jsou prostoupeny kapilárami. Kapiláry nejsou zřetelné v solidních částech tumoru (ARGANI et. a. 2001).

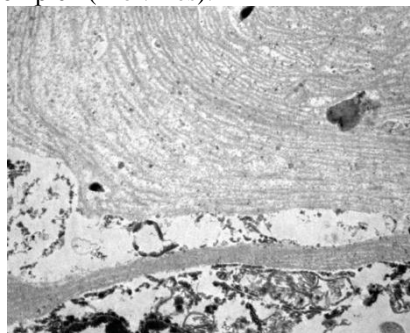
**Obrázek 7:** Pseudorozetový karcinom. Vlevo: makroskopický snímek, vpravo: mikroskopický snímek barvení HE (Prof. Hes).



Imunohistochemicky je tumor, zvláště pak jeho eozinofilní buňky, pozitivní na vimentin. Dále je pozitivní na epiteliální markery AE1/AE3, cytokeratin CAM 5.2., CK7 a EMA. Epitelioidní buňky jsou též fokálně silně pozitivní na melanocytický marker HMB45 a Melan-A (ARGANI et al. 2001), což je důležité pro jejich diagnostiku (HES, osobní sdělení). MARTIGNONI et al. (2009) zjistili, že tento tumor se dá dobře odlišit od běžných typů renálních karcinomů pomocí protilátky proti kathepsinu-K, jehož expresi zvyšuje právě *TFEB*.

Elektronová mikroskopie (viz obrázek 8) odhalila abundantní mitochondrie, Golgiho komplex a drsné endoplazmatické retikulum. V cytoplazmě též obsahuje četné elektron-denzní granule podobné melanosomům, avšak premelanosomy ani melanosomy nebyly nalezeny.

**Obrázek 8:** Snímek z elektronového mikroskopu tumoru t(6;11) zobrazující abundantní Golgiho komplex (Prof. Hes).



Analýzou dvou vzorků pseudorozetového tumoru bylo zjištěno, že *TFEB* gen (na lokusu 6p21) v těchto tumorech fúzuje s genem *Alpha* lokalizovaném na lokusu 11q13. *Alpha* přitom nemění sekvenci ani funkci *TFEB*, ale až 60krát zvyšuje jeho expresi, takže tento tumor může vznikat díky aberantní expresi *TFEB* genu (DAVIS et al. 2003, KUIPER et al. 2003).

### **3.1.8 Collecting duct carcinoma (Karcinom ze sběrných duktů)**

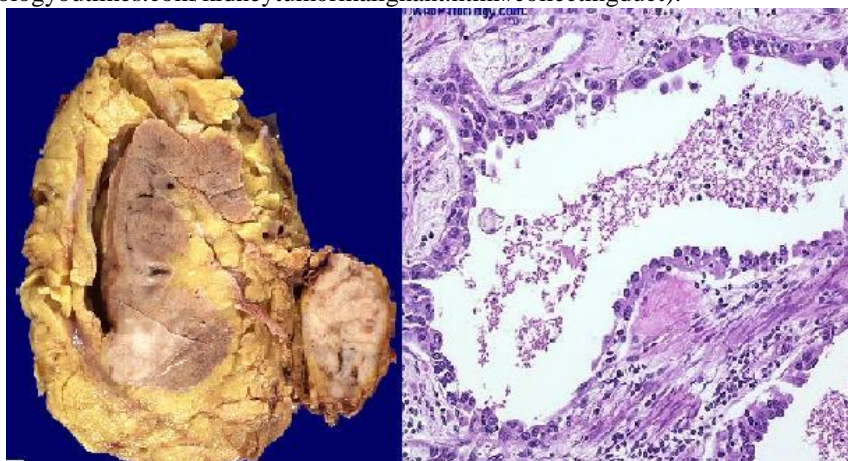
Tento typ nádoru byl poprvé popsán v roce 1955 Pierre Massonem, který tento tumor identifikoval jako polycystický tumor horního pólu ledviny. Od roku 1955 dodnes bylo popsáno více než 100 případů tohoto karcinomu. Průměrný věk pacientů je 55 let, vyskytuje se 2x častěji u mužů než u žen. Pochází pravděpodobně z medulárních pyramid ledviny (MICHAL et al. 2000).

Patří mezi velmi agresivní tumory. Téměř polovina pacientů má v čase diagnózy metastázy v lymfatických uzlinách, nadledvinách, kostech a plicích (MICHAL et al. 2000).

Makroskopicky jde o infiltrativně rostoucí tumor bílé barvy, který je tuhý, často s nekrózami. Tumor dosahuje velikostí 2,5 - 12cm (průměrně 5cm) (MICHAL et al. 2000).

Histologicky je tumor tvořen tubuly, které tvoří cysty nebo čepy. Často je infiltrován zánětlivou reakcí. Buňky jsou v tubulech uspořádány cvočkovitě a mají eozinofilní cytoplazmu (MACLENNAN et al. 1997). Makroskopické i mikroskopické zobrazení tohoto tumoru je na obrázku 9.

**Obrázek 9:** Vlevo makroskopický obrázek „Collecting duct carcinoma“ infiltrující tukový obal ledviny; vpravo mikroskopický obrázek s buňkami vytvářejícími struktury podobné tubulům (<http://www.pathologyoutlines.com/kidneytumormalignant.html#collectingduct>).



Imunohistochemicky vykazuje tumor pozitivitu s keratiny, vimentinem a EMA (MICHAL et al. 2000).

FÜZESI et al. (1992) cytogeneticky detekoval aberace u tří případů „collecting duct carcinoma“. Jednalo se o monosomie chromozomů 1, 6, 14, 5 a 22.

### 3.1.9 Tubulocystický karcinom ledviny

Tento karcinom je velmi vzácný. V literatuře bylo dosud popsáno méně než 100 případů. TRK (viz obrázek 10) se vyskytuje predominantně u mužů, ve velmi širokém věkovém rozmezí 29-94 let a vykazuje jen mírné sklony k malignímu charakteru, tj. tvorbě metastáz (HORA et al. 2010). TRK se často vyskytuje společně s PRK, přičemž někdy jsou oba nádory dobře odděleny, jindy tvoří společné ložisko, což naznačuje, že TRK může tvořit podtyp PRK (ZHOU et al. 2009). K příbuznosti s PRK přispívá i fakt, že TRK i PRK se často vyskytují jako multicentrické, což není běžný jev u ostatních renálních karcinomů (RICHSTONE et al. 2004, CRISPEN et al. 2008, ZHOU et al. 2009). Byl popsán jeden případ, kdy se TRK vyskytoval spolu s mikropapilárním uroteliálním karcinonem a SRK v jedné ledvině (GÖNÜL et al. 2009).

Původně platil předpoklad, že TRK jsou odvozeny od karcinomů ze sběrných duktů. TRK ale postrádal jeho agresivní charakter, tudíž se pro něj dříve používal název „low-grade collecting duct carcinoma“ (MACLENNAN et al. 1997).

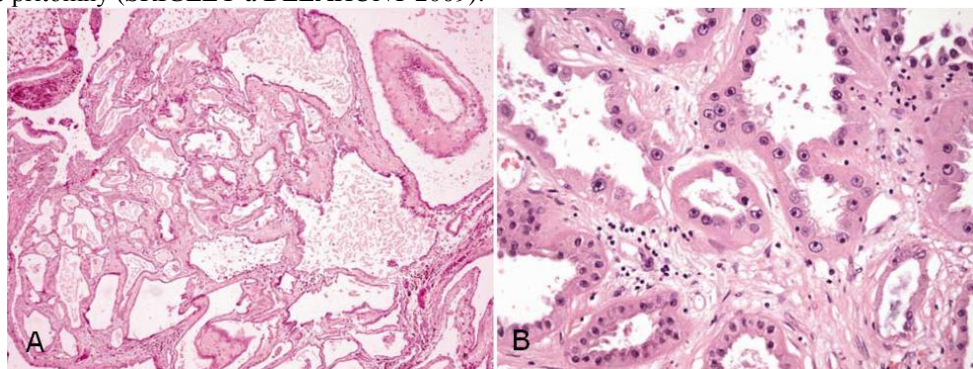
TRK se může vyskytovat jak na pólech ledviny, tak v její centrální části. Podle dostupných informací se velikost nádoru pohybuje obvykle v rozmezí 0,7-17cm, s průměrem kolem 4,2 - 5cm (MACLENNAN et al. 1997, Amin et al. 2009). Může mít



vzhled solidních nádorů, mnohonásobných cyst nebo jejich přechodu. Barva nádoru se pohybuje od bílé přes šedou, žlutou až do růžové. Může se též vyskytovat hemorhagie či nekróza. Vzácně může prorůstat do tukového obalu ledviny (MACLENNAN et al. 1997).

Mikroskopicky mají TRK velmi jednotný vzhled s proliferujícími tubuly a cystickými tubuly, které jsou často rozšířené i do stroma. Některé z cyst mohou v průměru dosahovat až 1cm. Tubuly a cysty jsou lemovány jednovrstevným plochým, cvočkovitým, kubickým až cylindrickým epitelem. Většina buněk má hojný podíl eozinofilní cytoplazmy v poměru k jádru, což připomíná buňky RO. Nádory nevykazují solidní růst. Jádra jsou kruhová s nepravidelnou jadernou membránou a nepravidelně rozmístěným chromatinem (AMIN et al. 2009).

**Obrázek 10:** Tubulocystický renální karcinom. A: Tubuly variabilní velikosti a cysty lemované jednou vrstvou eozinofilních buněk. B: Tubuly s buňkami, které mají abundantní cytoplazmu. cvočkovité buňky fokálně přítomny (SRIGLEY a DELAHUNT 2009).



Imunohistochemicky je TRK silně pozitivní na CK19, CD10 a P504S. Slabě pozitivní na CK7 a negativní na CK34 $\beta$ E12 (AZOULAY et al. 2007).

Elektronová mikroskopie těchto nádorů odhalila četné mikroklky s kartáčovým lemem připomínajícím proximální tubulus. Bylo též nalezeno velké množství mitochondrií (Amin et al. 2009).

Pomocí aCGH bylo zjištěno, že se v TRK vyskytuje zisk chromozomu 17 (YANG et al. 2008). Zhou et al. (2009) studovali aneuploidie chromozomů 7, 17 a Y pomocí FISH u 12 případů TRK a zjistili, že u 10 z 12 případů se vyskytla trisomie chromozomu 7, 8 z 12 případů vykazovalo trisomii chromozomu 17 a 8 z 9 případů mělo ztrátu Y chromozomu. Přičemž všechny tyto aberace vykazovalo 6 z 9 případů, kde byly studovány všechny 3 aberace.

Microarray odhalila 53 overexprimovaných a 126 underexprimovaných genů. Obvykle byly overexprimovány geny metabolismu aminokyselin a buněčného cyklu. Underexprimovány byly geny zodpovědné za metabolismus biopolymerů. (AMIN et al. 2009)

OSUNKOYA et al. (2009) studovali rozdíly hůadin mRNA několika genů pomocí Real-Time RT PCR mezi TRK a „Collecting duct carcinoma“ kvůli porovnání jejich příbuznosti. Výsledky ukázaly, že TRK má poměrně vysokou hladinu mRNA pro p53 a E-Kadherin, tyto rozdíly však nebyly statisticky významné.

Při léčbě se zdá, že po nasazení sunitinibu dochází k částečné regresi onemocnění, což zajistí o něco delší přežití pacientů (MEGO et al. 2008, HORA et al. 2010).

Přestože TRK vykazuje spoustu jedinečných rysů, nebyla prozatím rozpoznána jako samostatná jednotka ve WHO klasifikaci z roku 2004 (EBLE et al. 2004).

### 3.2 Angiogeneze u renálních karcinomů

Je známo, že růst nádorů je závislý na angiogenezi (FOLKMAN 1990) a že s výraznou angiogenenní aktivitou se zvyšuje riziko rozvoje metastáz (WEIDNER et al. 1991).

Buňky nádorů musí být vzdálené maximálně 0,2mm od kapilár, aby k nim mohl difundovat O<sub>2</sub>. Při delších vzdálenostech se dostávají do hypoxického stavu, ve kterém enzym závislý na kyslíku stabilizuje HIF-1 $\alpha$  redukcí jeho prolinových zbytků, které jsou při normoxii hydroxylovány. Tento pak není rozeznán VHL proteinem k degradaci. HIF-1 $\alpha$  pak může dimerizovat s HIF- $\beta$  a spustit signální kaskádu vedoucí k expresi genů spouštějících angiogenezi jako je *VEGF*, *PDGF*, *TGF- $\alpha$* , *erythropoetin* a další. Při hypoxii je exprese HIF-1 $\alpha$  asi 10x vyšší než při normoxii a je také více stabilní (WEINBERG 2007).

Existuje teorie, že buňky nádoru nemají na začátku bujení schopnost vyvolávat angiogenezi, ale že jí musí získat. Do té doby (i několik let) jsou v latentním stavu, kdy se sice rychle dělí, zároveň však stejné procento buněk zaniká (postupuje apoptózu), takže ve výsledku má nádor stále stejnou velikost. Apoptózu v tomto případě často zprostředkovává tumor-supresorový protein p53 (WEINBERG 2007).

Po určité době získá jisté procento těchto buněk (klon) schopnost spouštět angiogenezi, čímž dostávají výhodu nad ostatními svými klony a vytvoří největší část

masy nádoru. Tomuto ději se říká **angiogenní „switch“**. Angiogenní switch začínají obvykle tzv.  $\beta$ -buňky nádoru, které produkují vysoká množství VEGF, který je ovšem pohlcován extracelulární matrix (ECM) nádoru a nedostane se tak k endotelovým buňkám, které má aktivovat. Angiogenní switch je tedy úzce spřažen se zvýšením hladin matrix metaloproteáz, které uvolňují zánětlivé buňky dostávající se do nádoru. Nádor pak prorazí svoji bazální membránu. MMPs pak rozruší ECM a VEGF signál se dostane k prekurzorům endotelových buněk (váže se na jejich receptory FLT-1 a KDR) v okolní tkáni, které se tímto signálem aktivují, maturují a poté vytvářejí cylindrické stěny budoucích kapilár na síti fibrinových vláken, které pak rostou ve směru zvyšující se koncentrace angiogenních faktorů. Dále to usnadní únik fibrinogenu a plazminogenu a jejich přeměnu na fibrin a plazmin. Fibrin tvoří již zmíněný podklad vláken pro tvorbu nové cévy, plazmin přispívá k rozpouštění ECM. Dalšími signály kromě VEGF může být bFGF, který se váže na FGFR, dále SDF-1 myofibroblastů nacházejících se ve stroma nádoru a další. Tvorbu kapilár usnadňují další matrix metaloproteázy MMP1-4, které usnadňují prorůstání nově vznikajících kapilár přes ECM. Po vzniku cylindrických stěn stimulují angiopoetiny 1 - 2 endotelové buňky k rekrutování murálních (nástěnných) pericytů a buněk hladkých svalů, se kterými vytvářejí kompletní kapiláru. Mezi množstvím těchto tří typů buněk musí být rovnováha, která je ve zdravých tkáních zajišťována angiogenními a antiangiogenními faktory. Jejich hladiny jsou v nádorech deregulovány, čímž vzniká nepoměr i mezi množstvím těchto typů buněk a proto jsou kapiláry v nádorech často i 3x širší a vzhledem k často vysoké hladině VEGF také až 10x propustnější než v okolní zdravé tkáni. Toto může způsobit hromadění tekutin v nádorech a pravděpodobně i vznik hemoragií (KLENER 2002, WEINBERG 2007).

MMP jsou blokovány molekulami TIMPs, jež tak působí proti angiogenezi.

Jak bylo výše řečeno, p53 zprostředkovává apoptózu nádorových buněk, které jsou daleko od cév a tím pádem nemají dostatečné zásobení kyslíkem pro svůj růst. Další jeho důležitou funkcí je inhibice již probíhající angiogeneze, kdy p53 indukuje tvorbu trombospondinu-1 (Tsp-1), který se poté nachází v extracelulární matrix a váže se na aktivní endotelové buňky, které spustí produkci ligandu Fas, který se naváže na těchto endotelových buňkách na receptor FasR, což způsobí jejich apoptózu. To, že se Tsp-1 naváže jen na aktivní endotelové buňky má výhodu v tom, že tento mechanismus zasáhne jen právě se tvořící cévy a ne již vytvořené cévy. Naopak proti Tsp-1 působí onkogen Ras (H-Ras v melanomech), který je antagonistou p53. Apoptózu

endotelových buněk spouští též alternativním splicingem změněná molekula tryptofanyl-tRNA-syntetázy (WEINBERG 2007).

### 3.3 Studované geny v expresi TRK

Základní informace o studovaných genech např. umístění na chromozomu a základní charakteristiky, které nejsou bezpodmínečně nutné pro pochopení výsledků, byly použity z webových stránek <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> a <http://www.genecards.org/>.

#### 3.3.1 PTEN

PTEN je tumor-supresorový protein, jehož gen je lokalizovaný na chromozomu 10q23, což je region, který je často deletován u CHRK a také v nižším procentu případů SRK. Delece tohoto regionu u SRK může předpovídat vyšší agresivitu nádoru – úmrtnost byla 85,7% oproti 45,3% u nedeletované formy (VELICKOVIC et al.. 2002). Jeho funkce spočívá v blokaci PI3K/Akt dráhy. Jeho mutace, vyskytující se u některých druhů nádorů, tedy způsobují zvýšení aktivity PI3K/Akt a tím i HIF-1 $\alpha$  (WU et al. 1998, ZUNDEL et al.. 2000). Reguluje též VEGF (ZHIYONG et al. 2011).

#### 3.3.2 PI3K/Akt pathway

*Akt2* se nachází na 19q13.1-q13.2. *Akt3* je na lokusu 1q44. *PI3K* je na lokusu 3q26.3, protein se skládá z 1068 amk.

Na studiích buněčných linií rakoviny prostaty bylo ukázáno, že aktivace PI3K/PTEN/Akt/mTOR-ové dráhy vede ke zvýšení exprese HIF-1 $\alpha$  a také exprese VEGF (ZHONG et al.. 2000). Inhibicí PI3K dojde ke snížení HIF-1 $\alpha$ , ale hladina HIF-2 $\alpha$  zůstává nezměněna (BLANCHER et al.. 2001). TOSCHI et al.. (2008) došel k závěrům, že HIFy jsou závislé na různých izoformách Akt v buněčných liniích deficientních pro VHL a sice, že HIF-1 $\alpha$  je závislý na Akt3 a HIF-2 $\alpha$  na Akt2.

#### 3.3.3 mTOR

*MTOR (FRAP1)* je lokalizován na 1p36.2 s protein se skládá 2549 aminokyselin. S dalšími proteiny vytváří komplex, který je downstream komponentem PI3K/Akt signální dráhy (HUDSON et al. 2002). Existují dvě formy tohoto komplexu: mTORC1

a mTORC2. Bylo prokázáno, že HIF-1 $\alpha$  je závislý na mTORC1 i mTORC2 a HIF-2 $\alpha$  je závislý jen na mTORC2. Akt2 reguluje mTORC2 a Akt3 reguluje mTORC1 (TOSCHI et al.. 2008).

### 3.3.4 VHL

Jak již bylo řečeno, von Hippel-Lindau je tumor supresorový protein, který patří mezi komplex E3 ubiquitin ligázy. Nachází se na krátkém raménku 3. chromozomu (3p25), jehož ztrátou se vyznačuje především SRK (SEIZINGER et al.. 1988).

Gen se skládá ze 3 exonů a kóduje 2 izoformy, jednu s 213 aminokyselinami (AMK) o váze 30kDa a druhou kratší se 160 amk, jejíž hmotnost je 19kDa. Jeho mRNA je exprimována ve všech tkáních a to jak ve fetálních, tak u dospělých jedinců (RICHARDS et al.. 1996).

Nejčastějšími mutacemi pozorovanými u genu VHL jsou frameshift inserce a delece, nonsense mutace a missense mutace. PVHL je stabilní protein, ale missense mutace mohou způsobit nestabilitu vyúsťující v neúčinnost nebo nedostatečnost proteinu (KNAUTH et al.. 2006).

Imunoznačením bylo zjištěno, navzdory očekávání, že absence jakýchkoliv VHL mutací u pacientů s SRK je spojena s vyšší úmrtností a také s vyšší expresí VEGF (PATARD et al.. 2009). Nejčastěji nacházíme mutace VHL v kapse místa pro vazbu HIF (WEINBERG 2007).

### 3.3.5 HIF

*HIF-1 $\alpha$*  se nachází na lokusu 14q23.2, protein je složený z 826 amk. *HIF-2 $\alpha$*  je lokalizován na 2p21, protein je dlouhý 870amk a *HIF $\beta$*  je lokalizován na 1q21.3 a jeho protein je dlouhý 791 amk.

Angiogeneze je spouštěna především hypoxickým stavem nádoru, kdy hladina kyslíku v okolí klesá pod 5%. Hypoxie vede ke stabilizaci heterodimerních transkripčních faktorů hypoxia inducible factors (HIF) (WANG a SEMENZA 1995), které regulují celou řadu dalších genů. HIFy se skládají z alfa podjednotek HIF-1 $\alpha$  nebo HIF-2 $\alpha$ , jejichž stabilita závisí na koncentraci kyslíku, a konstitutivně se exprimující beta podjednotky nazývané ARNT. Po složení alfa podjednotky s beta podjednotkou dojde k nasednutí komplexu na hypoxia response element (HRE) (KEITH et al.. 2001, MALTEPE et al.. 1997). Při normoxii jsou alfa podjednotky hydroxylovány na

prolinech 402 a 564 u HIF-1 $\alpha$  a 405 a 531 u HIF-2 $\alpha$  pomocí hydroxyláz závislých na O<sub>2</sub>, což umožňuje navázání a ubiquitinizaci pomocí von Hippel-Lindau (VHL) tumor supresorového proteinu (BRUICK a MCKNIGHT 2001, EPSTEIN et al.. 2001, JAAKKOLA et al.. 2001, MASSON et al.. 2001, YU et al.. 2001). Hypoxie nebo mutace či ztráta genu VHL vede ke zvýšení aktivity HIF $\alpha$  (COCKMAN et al.. 2000) a následně VEGF, což vede ke zvýšení aktivity genů, které jsou zahrnuty ve vzniku a progresi nádorových onemocnění (MAYNARD a OHH 2004, PETRELLA et al.. 2005). HIF-1 $\alpha$  má jak proproliferativní, tak antiproliferativní vlastnosti, HIF-2 $\alpha$  má pouze proproliferativní vlastnosti (GORDAN a SIMON 2007). Na buněčných liniích byla též ukázána interakce mezi samotnými alfa podjednotkami, kdy overexpresí HIF-1 $\alpha$  v buňkách klesla exprese HIF-2 $\alpha$  a naopak, spolu s cílovými geny těchto podjednotek. Přičemž HIF-1 $\alpha$  zpomaloval růst nádoru a HIF-2 $\alpha$  ho naopak urychloval (RAVAL et al.. 2005). HIF-1 $\alpha$  je exprimován ve všech typech buněk a funguje jako hlavní regulátor kyslíkové homeostázy (SEMENZA 2004). HIF-2 $\alpha$  je exprimován především v endotelových buňkách (EMA et al.. 1997).

Bylo již identifikováno více než 100 cílových genů, které jsou transkribovány pomocí HIFs. Mezi ně patří především geny kódující angiogenetické faktory jako *VEGF* a *PDGF*, dále geny pro glukózový metabolismus, proliferaci a erytropoézu (EPSTEIN et al.. 2001).

Vysoká exprese HIF-1 $\alpha$  a naopak nízká exprese HIF-2 $\alpha$  by mohly vést ke zvýšení počtu buněk podstupujících apoptózu vlivem radiační terapie (BERTOUT et al. 2009).

### 3.3.6 VEGFA

*VEGFA* je umístěn na lokusu 6p12. Izoformy VEGFA proteinu mají 121, 145, 165, 189 a 206 amk.

VEGFA je člen rodiny PDGF/VEGF faktorů a skládá se z homodimerických glykoproteinů. Interaguje s tyrosin-kinázovými receptory VEGFR1 a VEGFR2 a reguluje funkci endotelových buněk (LIAO a JOHNSON 2007). Vysoká hladina VEGF je spřažena s vyšší agresivitou nádorů ledvin i jiných tkání.

Jeho delece způsobí, že u tumoru nikdy nedojde k angiogennímu „switch“ – je tedy pro tento proces klíčový. Kromě stimulace angiogeneze stimuluje tvorbu prekursorů endotelových buněk v kostní dřeni (WEINBERG 2007).

### **3.3.7 PDGFA**

*PDGFA* je lokalizován na lokusu 7p22, tvoří homo- a heterodimery PDGFA nebo s PDGFB. Interaguje se dvěma receptory a je domnělým mitogenem pro buňky pojivových tkání.

### **3.3.8 bFGF**

Basic fibroblast growth factor je lokalizován na 4q26. BFGF je širokospektrý mitogenní, angiogenní a neurotrofní faktor. Je exprimován v mnoha typech tkání a je součástí angiogenní dráhy, hojení ran a růstu nádorů.

### **3.3.9 EGF**

Gen pro EGF je lokalizován na 4q25 a funguje pravděpodobně jako mitogenní faktor pro tkáň ektodermálního a mezodermálního původu. Má 24 exonů a prekurzor proteinu má 1207aminokyselin (BELL et al. 1986), z něho je odstřižen hotový protein, který má 53 aminokyselin. EGF podporuje diferenciaci epitelálních buněk (URDEA et al. 1983). Vysoká exprese EGF byla detekována v ledvinách, ve slinných žlázách, v mozku a v prostatě. Žádná exprese nebyla detekována v nadledvinách, játrech, mozečku a placentě (GROENESTEGER et al. 2007).

### **3.3.10 EGFR**

Gen pro EGFR se nachází na 7p12 a se svým ligandem EGF je zahrnut v různých buněčných funkcích, např. v buněčné proliferaci, diferenciaci, přežívání, pohybu a také ve vývoji tkání. Jeho exprese bývá zvýšená u mnoha typů nádorů, kde je často též mutován (PENAULT-LLORCA et al. 2005, ZIMMERMANN et al. 2006, THOMAS et al. 2006b).

### **3.3.11 FLT1**

*FLT1* je lokalizován na 13q12. Je to tyrosin-kinázový receptor pro VEGFA důležitý pro kontrolu buněčné diferenciace a proliferace. Protein se skládá z 1338 amk.

### 3.3.12 KDR

Gen pro KDR je lokalizován na lokusu 4q11-12 a má obdobnou funkci jako FLT1. Protein se skládá z 1356 amk.

Bylo zjištěno, že knock-out VEGFR a PDGFR genů nezabrání progresi SRK, tudíž VEGFR a PDGFR signální dráhy jsou možná nadbytečnými růstovými signálními drahami. Ale jsou esenciální pro proliferaci endotelových buněk (HUANG et al. 2010).

### 3.3.13 H-Ras

*H-Ras* celým názvem V-HA-RAS harvey rat sarcoma viral oncogene homolog je gen lokalizovaný na 11p15.5. Jeho protein se skládá ze 189 amk, je zahrnut v mnoha buněčných procesech. Je součástí rodiny homologních GTPase switch proteinů H-Ras, K-Ras a N-Ras.

### 3.3.14 Fos + Jun

Gen pro Fos se nachází na 14q24.3. Je hlavní komponentou transkripčního faktoru AP-1. Protein Fos se skládá z 380 aminokyselin. JUN, jehož gen se nachází na 1p32-31, je druhou hlavní komponentou transkripčního faktoru AP-1 s proteinem dlouhým 331 aminokyselin. AP-1 je faktor zahrnutý v buněčné proliferaci, transformaci a buněčné smrti (SHAULIAN a KARIN et al. 2002). AP-1 navíc upreguluje VEGF (DAMERT et al. 1997).

### 3.3.15 p53

P53 je tumor-supresor lokalizovaný na lokusu 17p13.1, má 11 exonů, je zodpovědný za regulaci zadržení buněčného cyklu, za apoptózu, opravy DNA nebo změny metabolismu. Je mutován ve většině nádorových bujení tak, že není schopen vykonávat své funkce (SOUSSI et al. 2005). Bylo zjištěno, že p53 způsobuje mimo jiné ubiquitinem zprostředkovanou degradaci HIF-1 $\alpha$  a to prostřednictvím E3-ubiquitin protein ligasy MDM2 (RAVI et al. 2000). Tento mechanismus je obdobný regulaci HIF-1 $\alpha$  pomocí VHL. Mutace p53 tedy může vést ve svém důsledku ke zvýšení angiogeneze indukci VEGF, ale též snížením inhibitorů jako je Tsp-1 (DAMERON et al. 1994).



### 3.3.16 MT1-MMP

MT1-MMP se nachází na 14q11.2. Její protein se skládá z 582 amk.

PETRELLA et al. (2005) identifikoval jako jeden z cílů HIF-2 $\alpha$  sekvenci -125 v promotoru „Membrane Type-1 Matrix Metaloprotease“ (MT-1MMP), jejíž zvýšená exprese předurčuje nádor k vyšší invazivitě. Produkt genu MT1-MMP je kolagenolytický enzym I. typu (PETRELLA a BRINCKERHOFF 2006).

PETRELLA a BRICKERHOFF (2009) provedli pokus, při kterém na buněčných liniích s deficientním VHL ukázali, že angiogeneze nemusí být vždy zvýšená pomocí zvýšeného množství proteinu – konkrétně HIF-2 $\alpha$ , ale že může být pouze zvýšená jeho aktivita prostřednictvím úbytku molekuly Ying Yang 1 (YY1), která funguje jako represor HIF-2 $\alpha$ . Tento efekt se tedy pravděpodobně neprojeví ani na množství mRNA genu HIF-2 $\alpha$ , které je zjištěné pomocí Real-Time PCR. Vysoké množství mRNA genu MT-MMP1 by tedy mohlo poukázat na zvýšenou transkripční aktivitu genu HIF-2 $\alpha$ . Ovšem tvrzení, že se množství HIF-2 $\alpha$  nemění, nesouhlasí s výsledky pokusů TOSCHI et al. (2008), na které upozornili sami autoři. Toschi et al. (2008) došli k závěru, že se hladina proteinu mění, avšak pracovali za pozměněných podmínek.

### 3.3.17 E-Kadherin

Gen pro E-Kadherin je lokalizován na lokusu 16q22.1. Je to adhezní molekula závislá na Ca<sup>2+</sup>.

Jeho snížená exprese svědčí pro snazší tvorbu metastáz. Bylo prokázáno, že VHL zvyšuje degradaci HIF-1 $\alpha$  expresi E-cadherinu. HIF-1 $\alpha$  produkuje represory E-Kadherinu, tudíž degradaci HIF-1 $\alpha$  je umožněna exprese E-Kadherinu (ESTEBAN et al. 2006, EVANS et al. 2007). Imunohistochemické analýzy VHL a E-Kadherinu ukázali, že nízká exprese E-Kadherinu a VHL ukazuje na horší prognózu SRK a naopak pozitivní exprese obou markerů ukazuje na lepší prognosu onemocnění (GERVAIS et al. 2007).

### 3.3.18 Beta-katenin

Gen pro CTNNB1 se nachází v lokusu 3p21. CTNNB1 je protein, který je zodpovědný za adhezní spoje nutné pro soudržnost epiteliálních buněk a komunikaci mezi buňkami. Bylo zjištěno, že by mohl fungovat jako onkogen a jeho vyšší exprese a

lokalizace v jádrech buněk může aktivovat mnoho genů, které zrychlí růst buněk, přežití buněk (WANG et al. 2008) a jejich proliferaci (SALDANHA et al. 2004). Negativně reguluje E-cadherin, přičemž sám beta-catenin je jím zpětně také negativně regulován (LI et al. 2011). Dále se ukázalo, že beta-catenin zvyšuje expresi mTORu (FUJISHITA et al. 2008).

### 3.3.19 NF- $\kappa$ B

*NF- $\kappa$ B* se nachází na 4q24 a má 24 exonů. NF- $\kappa$ B je transkripční faktor, heterodimer, skládající se ze dvou podjednotek p65 a p50. Reguluje mnoho buněčných procesů, jako jsou imunitní odpověď (ALCAMO et al. 2001), zánětlivé procesy (WEIH et al. 1995), migraci buněk (MAIER et al. 2010), apoptózu (BEG et al. 1995) a angiogenezi (METEOGLU et al. 2008, MORAIS et al. 2009). V normálních buňkách je na něm navázán inhibitor I- $\kappa$ B, který blokuje jeho aktivitu. V nádorových buňkách je ale I- $\kappa$ B fosforylován a degradován, což umožňuje NF- $\kappa$ B se translokovat do jádra a spouštět transkripci mnohých genů. Pomocí imunohistochemické analýzy byla objevena korelace mezi NF- $\kappa$ B s VEGF proteiny a mutantní p53, což naznačuje, že NF- $\kappa$ B podporuje angiogenezi a zabraňuje apoptóze (METEOGLU et al. 2008). MORAIS et al. (2009) při inhibicích NF- $\kappa$ B pyrrolidin dithiocarbamátem překvapivě nedetekoval snížení VEGF, ale zato detekoval výrazné snížení EGF s tím, že byla kompletně znemožněna angiogeneze. Studie byla prováděna na kultuře lidských endoteliálních buněk s RK liniích. NF- $\kappa$ B signální dráha může být inhibována proteinem RASSF6 (ALLEN et al. 2007).

Zvýšená aktivita NF- $\kappa$ B byla nalezena v některých RK a pravděpodobně souvisí s paraneoplastickým syndromem a rozvojem nádoru (OYA et al. 2003). NF- $\kappa$ B je konstitutivně aktivován v nádorových buňkách, které odolávají TRAIL vyvolané apoptóze. TRAIL vyvolává specificky apoptózu v nádorových buňkách, ale ne ve zdravých buňkách (OYA et al. 2001).

Molekulární dráhy nastíněné v této kapitole jsou z větší části založeny na experimentech na rozličných buněčných liniích, které mají mutace v různých genech a jen simulují některé typy RK. Chování těchto genů v reálném nádoru tedy nemusí odpovídat chování v buněčných liniích.

Některé geny se chovají rozdílně i mezi jednotlivými liniemi. RAVAL et al. (2005) například demonstroval rozdílné chování VEGF na RNA interferenci HIF-1 $\alpha$

faktoru mezi buněčnou linií RK 786-O, která má mutaci v genu pro VHL a linií CAKI-1, která tuto mutaci nemá.

### 3.3.20 NOS3

*NOS3* se nachází na 7q36. Gen má 28 exonů a protein se skládá z 1294 amk. NOS3 je zodpovědný a produkci oxidů dusíku v endoteliálních buňkách, což napomáhá angiogenezi (PRANGSAENGTONG et al. 2011).

## 3.4 Metylace u renálních karcinomů

V genomu se vyskytuje asi 30000 míst, kde se nachází tzv. CpG ostrůvky, neboli, kde se nachází cytosinové - guaninové dinukleotidy. Cytosiny v těchto nukleotidech mohou být metylovány. Většinou se CpG ostrůvky nacházejí v promotorech nebo prvních exonech genů. V promotorech fungují jako další regulátory exprese daných genů. Metylové skupiny jsou na cytosiny přenášeny enzymy ze skupiny DNA metyltransferáz, např. DNA metyltransferáza 1 je tzv. udržovací metyltransferáza (dodatečně metyluje druhý řetězec v průběhu S-fáze buněčného cyklu), DNA metyltransferáza 3B způsobuje de-novo metylaci. Pokud je daný úsek genu hypermetylován, je rozeznáván faktory (např. histon deacetylázami), které způsobí umlčení exprese daného genu a pokud je promotor hypometylován, tak je naopak gen aktivní a promotor přístupný aktivátorům transkripce (WILLARD a GINSBURG 2008). Metylace je účinná pouze v promotoru daného genu. Metylace prvního nebo dalších exonů má minimální nebo žádný vliv na expresi (WEINBERG 2007).

Metylace DNA má vliv na mnoho fyziologických procesů, jakými jsou lyonizace X chromozomu u žen nebo imprinting genů. Metylace začíná v ranné embryogenezi, je reverzibilní a klonálně dědičná.

V brzké karcinogenezi lze pozorovat globální demetylaci, což značí selhání udržovacích metyltransferáz (WEINBERG 2007). V nádorech má metylace vliv na mnoho tumor supresorových genů, které jsou obvykle hypermetylovány a naopak jsou hypometylovány geny (onkogeny) prospěšné nádoru. Metylace je tedy mimo mutací a delecí genů dalším mechanismem pro genovou inaktivaci (WILLARD a GINSBURG 2008). Bylo prokázáno, že polovina tumor-supresorových genů, které jsou mutovány ve familiárních typech nádorů, je ve sporadických formách těchto nádorů také umlčeno a to buď také mutací, nebo metylací (WEINBERG 2007). Hypermetylace promotorů

některých tumor supresorových genů se objevuje u mnoha typů rakovin, např. u rakoviny děložního čípku (SPATHIS et al. 2011), nádorů štítné žlázy (STEPHEN et al. 2011), retinoblastomu (DÁVALOS-SALAS et al. 2011), ovariálních tumorů (DAVIS et al. 2011), tumorů močového měchýře (CHEN et al. 2011) a dalších.

ARAI et al. (2011) použitím metylační arraye zjistili, že se běžné nádory ledvin (SRK, PRK, CHRK a RO) dají rozdělit pomocí svých profilů. CHRK a RO měly velmi podobné profily, ale přesto je bylo možné od sebe rozlišit.

Metylačním profilováním bylo prokázáno, že aberantní metylace se nenachází jen v nádorové tkáni, ale často i v přilehlé zdravé tkáni, což by naznačovalo, že aberantní metylace se objevuje už v prekancerózních stádiích nádorů a z jejího profilu by se tedy dal určit typ nádoru, který bude vznikat. Stejná studie poukázala také na to, že pokud se aberantní metylace vyskytuje u mnoha genů v nádoru, tak je spojena s nižším přežíváním pacientů (ARAI et al. 2011). Objevení se aberantní metylace v nenádorové tkáni může způsobit problémy s interpretací výsledků, kdy se porovnává zdravá tkáň s nádorovou od jednoho pacienta a ze stejné biopsie. Z tohoto pohledu by se jevilo ideální porovnávání nádoru od jednoho pacienta se zdravou tkání jiného pacienta, u něhož se neobjevila žádná nemoc, která by mohla metylační profil ledvin změnit.

Hypermethylace promotorů většího množství tumor supresorových genů může korelovat s přítomností metastáz a se špatnou prognózou (ELLINGER et al. 2011).

### **3.5 Léčba renálních karcinomů**

Standardní léčbou je parciální popř. radikální nefrektomie. Neexistuje účinná léčba u pacientů s neresekovatelným nádorem a pacientů s metastázami (<http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/RenalCellCarcinID5021.html>).

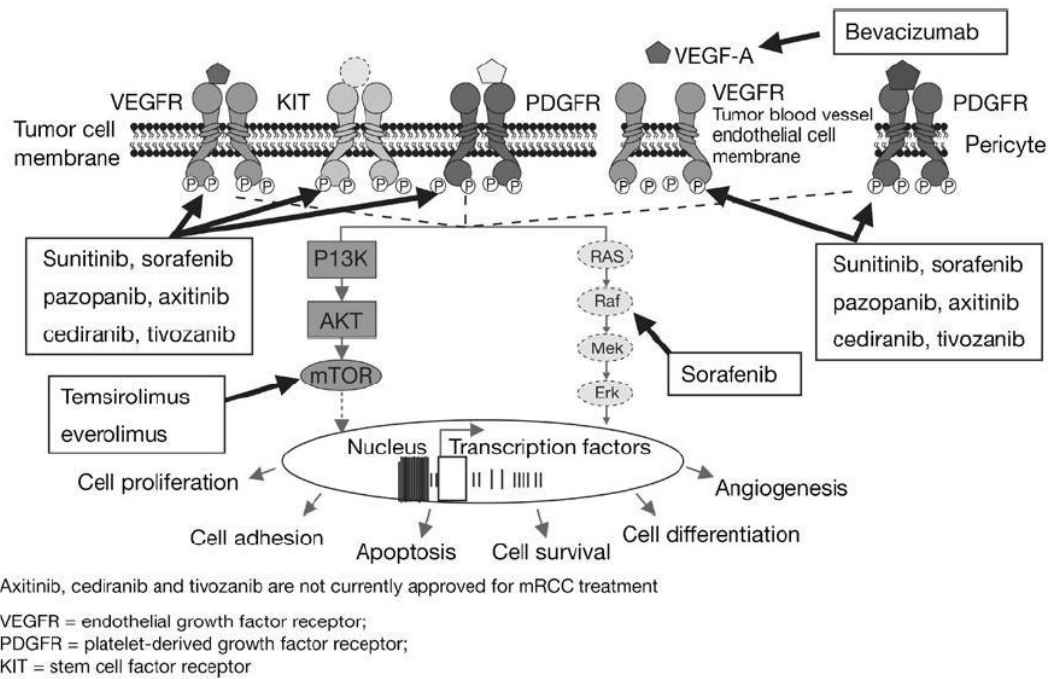
O RK je známo, že bývají resistantní ke standardním procedurám, které představují chemoterapie, hormonální terapie (YAGODA et al. 1995) a radioterapie (u ní je účinnost až 50% a mohla by sloužit pouze jako tiší terapie pro pacienty s neresekovatelnými RK) (DRUCKER et al. 2005). Proto se hledaly jiné, pokud možno účinnější, metody léčby. Před více než 10 lety se tedy začala vyvíjet a používat imunoterapie s interferonem alfa (IFN- $\alpha$ ) nebo interleukinem-2(IL-2), což ovšem pomáhá pouze malé části pacientů (<10% u IL-2 vs. 28% pro IFN- $\alpha$ ) (FYFE et al. 1995).

Vzhledem k tomu, že RK bývají velmi vaskularizovány, soustředila se pozornost na hledání léků, které by určitými způsoby potlačovaly angiogenezi. V dnešní době je používáno několik látek, které zamezují angiogenezi. Z těchto 4 působí jako antagonisti VEGFR dráhy ať už inhibicí ligandu, což je mechanismus bevacizumabu (ESCUDIER et al.. 2010), nebo inhibicí tyrosin-kinázové domény receptoru, kterou blokují sunitinib, sorafenib a pazopanib (ESCUDIER et al.. 2007, MOTZER et al.. 2009, RINI et al.. 2010, STENBERG et al.. 2010). Zbylé dva léky blokují mTORovou dráhu. Jedná se o everolimus a temsirolimus (HUDES et al.. 2007, MOTZER et a. 2008). Dalšími léky, které zatím nejsou schváleny pro použití při léčbě RK, a proto zde nebudou probírány, jsou axitinib, cediranib a tivozanib (NÉGRIER a RAYMOND 2011). Jednotlivé cíle daných léků dobře shrnuje obrázek 11 a schéma, podle kterého se často postupuje při léčbě RK, shrnuje obrázek 12. Souhrn cílů RTK inhibitorů je k nalezení v tabulce 1.

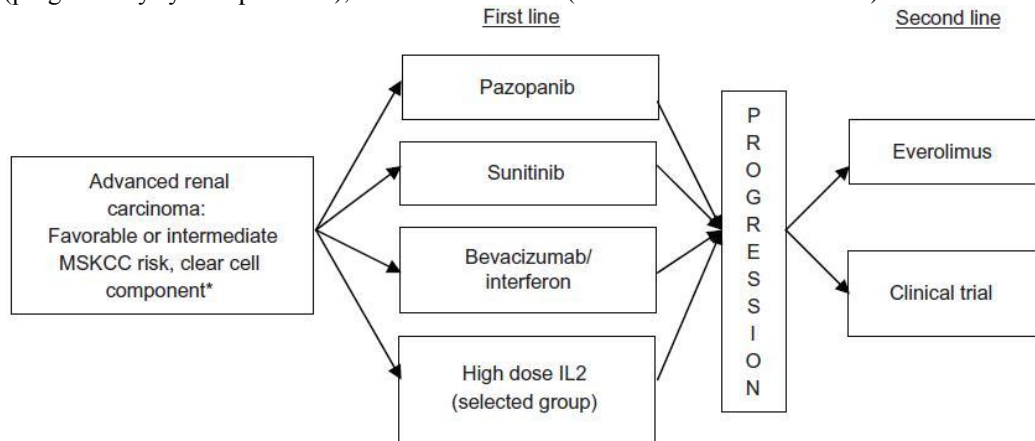
**Tabulka 1:** Cílové receptory schválených a neschválených (nových) léků, které jsou k použití v RK (Převzato z NÉGRIER a RAYMOND 2011).

	Cílové receptory												
	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	PDGFR- $\alpha$	PDGFR- $\beta$	KIT	FLT1	FLT3	FLT4	CSF-1R	RET	Raf	FGFR2
<b>Schválené léky</b>													
Sunitinib	√	√	√	√	√	√		√		√	√		
Sorafenib		√	√		√	√		√			√	√	
Pazopanib	√	√	√	√	√	√							
<b>Nové léky</b>													
Axitinib	√	√	√		√	√							
Cediranib	√	√	√		√	√	√		√				√
Tivozanib	√	√	√		√	√							

**Obrázek 11:** Cíle zasažitelné dostupnými antiangienními agens (NÉGRIER a RAYMOND 2011).



**Obrázek 12:** Schéma léčby pacientů s RK. MSKCC = Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (prognostický systém pro RCC), IL2 = interleukin 2 (LANG a HARRISON 2010).



**MSKCC risk status<sup>39,40</sup>**

1. Time from initial RCC diagnosis to start of therapy less than 1 year.
2. High lactate dehydrogenase; >1.5x ULN
3. Low serum hemoglobin
4. High corrected serum calcium; >10
5. Number of metastatic sites  $\geq 2$

**Favorable:** 0 Risk factors  
**Intermediate:** 1 or 2 Risk factors  
**Poor:**  $\geq 3$  Risk factors

**Dosing of agents**

1. Pazopanib 800 mg PO Daily for 4 weeks<sup>36</sup>
2. Sunitinib 50 mg PO Daily for 4 weeks on followed by 2 weeks off<sup>25</sup>
3. Bevacizumab 10 mg/kg D1 and D5; Interferon 9 MU SQ 3 times/week<sup>18,19</sup>
4. High Dose IL2 600,000 or 720,000 IU/kg IV q8 hours for up to 14 consecutive doses over 5 days<sup>6</sup>
5. Everolimus 10 mg PO Daily for 4 weeks<sup>41</sup>

### 3.5.1 Sunitinib

Sunitinib je malá molekula, která inhibuje fosforylaci receptorů tyrozin-kinázových, především VEGFR a PDGFR, dále KIT a FLT3 (MENDEL et al. 2003). HUANG et al. (2010) provedli sérii pokusů na různých buněčných liniích kvůli zjištění, jakou efektivitu by mohl mít sunitinib na SRK. Zjistili, že sunitinib ve farmakologicky relevantních koncentracích nezabrání progresi nádorových buněk jako takových, ale inhibuje endoteliální buňky tumoru, takže zabraňuje jen tvorbě cév. Nenalezli též korelaci mezi VHL mutovanými a nemutovanými tumory a efektivitou léčby.

### 3.5.2 Sorafenib

BAY 43-9006 neboli sorafenib je produkt farmaceutických společností BAYER a Onyx. Jedná se o bi-aryl ureu, která by mohla sloužit jako inhibitor Raf, Crf a Braf proteinů in vitro (AHMAD a EISEN 2004).

Studie na buněčných liniích a myších modelech prokázaly, že sorafenib blokuje autofosforylaci VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\beta$ , FLT-3, c-KIT, FGFR a fosforylaci ERK  $\frac{1}{2}$ . Dále byla snížena hodnota Ki-67, což marker proliferace a také exprese mutovaného i nemutovaného BRaf. Sorafenib nebyl aktivní např. vůči ERK-1, MEK-1, EGFR, HER-2, IGFR-1, c-met a PKB. Sorafenib se ukázal neúčinný u buněčné linie vykazující mutaci K-Ras (WILHELM et al. 2004). Dá se tudíž předpokládat, že vyšetření mutace K-Ras s pozitivním výsledkem bude kontraindikací k podávání sorafenibu.

Druhá a třetí fáze klinického testování poskytla zajímavá data. Hodnocení po 12 týdnech ukázalo, že 30% pacientů mělo stabilní nemoc (což bylo hodnoceno, pokud byla odpověď pacienta mezi 25% regresí nádoru nebo 25% progresí) a u 40% pacientů nádor vykazoval regresí o více než 25% (AHMAD a EISEN 2004).

Mezi nejčastější vedlejší účinky sorafenibu patřil vysoký tlak léčitelný  $\beta$ -blokátory, dále edémy, průjem, vyrážka a ztráta vlasů (AHMAD a EISEN 2004).

### 3.5.3 Pazopanib

Pazopanib je orálně podávaný inhibitor VEGF receptorů. Chemicky se jedná o [5- ( {4-2,3-dimethyl-2H-indazole-6-yl) methylamino} 2-pyrimidinyl} amino) 2methylbenzenesulfonamid (KUMAR et al. 2007). Na buněčných liniích simulujících mnohočetný myelom se ukázalo, že blokuje fosforylaci FLT-1, zvyšuje hladinu

adhezivních molekul ICAM-1 a VCAM-1. Celkově se dá říci, že inhibuje růst endotelových buněk spouštěný pomocí VEGF, přežití buněk, migraci a tvorbu cév. Zvyšuje naopak apoptózu buněk. Dále pazopanib snižuje hladinu c-Myc, čímž nepřímo snižuje i hladiny VEGF<sub>145</sub> a VEGF<sub>165</sub>, avšak hladina VEGF<sub>121</sub> zůstává nezměněna (PODAR et al. 2006).

Pazopanib inhibuje VEGFR1, VEGFR2 a VEGFR3, dále PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  a c-Kit. Mírně inhibuje také FGFR1 a FGFR3. Pokusy na myších ukázaly při použití pazopanibu silnou inhibici angiogeneze, především angiogeneze indukované VEGF a také bFGF (KUMAR et al. 2007).

V první fázi klinického testování pazopanibu, do které bylo zahrnuto 63 pacientů s různými nádory, z toho 12 pacientů s renálním karcinomem, bylo zjištěno mnoho vedlejších účinků. Mezi nejčastější patřila hypertenze, průjem, ztráta vlasů, nevolnost, anorexie a zvracení. Nejčastějšími hematologickými abnormalitami byla leukopenie a trombocytopenie a v krevním obraze byly nejčastějšími abnormalitami hypokalcemie, hypoalbuminemie, hypo- nebo hyperglycemie a zvýšené hodnoty AST a ALT. Proteinurie se vyskytla u 52% pacientů (HURWITZ et al. 2009).

#### **3.5.4 Bevacizumab**

Bevacizumab je monoklonální protilátka odvozená od myší VEGF protilátky A4.6.1. Je namířená přímo proti VEGF a její proteinová sekvence je z 93% lidská a z 7% myší, čímž se dosáhlo nižší imunogenicity oproti A4.6.1 (PRESTA et al. 1997).

Ve druhé fázi klinického testování pacientů s SRK nebyly pozorovány žádné život ohrožující toxické vlivy. Nejčastějšími vedlejšími účinky byly hypertenze, nevolnost a proteinurie. Skupina, která dostávala vysokou dávku bevacizumabu (10mg/kg váhy) měla dobu přežití bez progresu nemoci průměrně 2x délejší než skupina dostávající placebo (4,8 měsíce vs. 2,5 měsíce). U pacientů dostávajících 3mg bevacizumabu se jednalo o 3 měsíce. Bylo zajímavé, že hladina VEGF v průběhu léčby rostla (YANG et al. 2003).

#### **3.5.5 Everolimus**

Everolimus je orálně podávaný lék, který se s vysokou afinitou váže na intracelulární receptor FKBP12. Bylo prokázáno, že everolimus inaktivuje ribosomální protein S6K a vede k akumulaci buněk v G1 fázi (BOULAY et al. 2004). Everolimus ve



III. fázi klinického testování prokázal zvýšení doby přežití bez progresu nemoci z 1,9 měsíců u placebo skupiny na 4 měsíce u pacientů, kteří dostávali 10mg everolimu per os denně. Everolimus byl účinný u 63% pacientů. Mezi nejčastější vedlejší účinky patřily žaludeční záněty (u 40% pacientů), vyrážky (25%) a únava (20%) (MOTZER et al. 2008).

### **3.5.6 Temsirolimus**

Temsirolimus (CCI-779) je orálně podávaný lék, který se s vysokou afinitou váže na intracelulární receptor FKBP12 a tím inhibuje mTORC1, ale nemá téměř žádný efekt na mTORC2. Temsirolimus inhibicí mTORu ve výsledku může inhibovat celou řadu proteinů, mezi které patří například p27, BAD, Bcl2, cyklin D1 (LE TOURNEAU et al. 2008). Dále inhibuje HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$ , přičemž temsirolimus je nejúčinnější lék pro léčbu RK pacientů s defektním VHL (THOMAS et al. 2006a).

Bylo prokázáno, že inhibice mTORové dráhy má větší význam v léčbě PRK než SRK pravděpodobně díky vyšší expresi HIFs způsobené mutacemi fumarát-hydratázy (ANANDAPPA et al. 2010).

## **3.6 Vzácné nádory genitálního traktu**

Vzácné nádory genitálního traktu tvoří heterogenní skupinu malignit. V této části se budeme zabývat pouze typy, kterých se týkala naše studie. Zároveň přiblížíme dostupné informace o genu *FOXL2*.

Histologicky jsou níže popsané nádory velmi podobné. Juvenilní i adultní ATGCT vypadají stejně v ováriích i testes (EBLE et al. 2004).

### **3.6.1 Ovariální adultní typ nádoru buněk z granulózy**

Ovariální adultní typ tumoru buněk z granulózy tvoří 3,5 % všech ovariálních malignit. Průměrný věk pacientů se pohybuje kolem 50 let. Mezi klinické symptomy patří obvykle post-menopauzální krvácení, bolesti břicha, distenze břicha, nevolnost a nepravidelná menstruace, vše trvající několik týdnů či měsíců (CHUA et al. 2001). Velkým problémem u těchto tumorů je častá rekurence onemocnění, a to i po velmi dlouhé době (až 37 let po prvotní léčbě) a tudíž nutnost dlouhodobého sledování pacientů (HINES et al. 1996, MILLER et al. 1997).

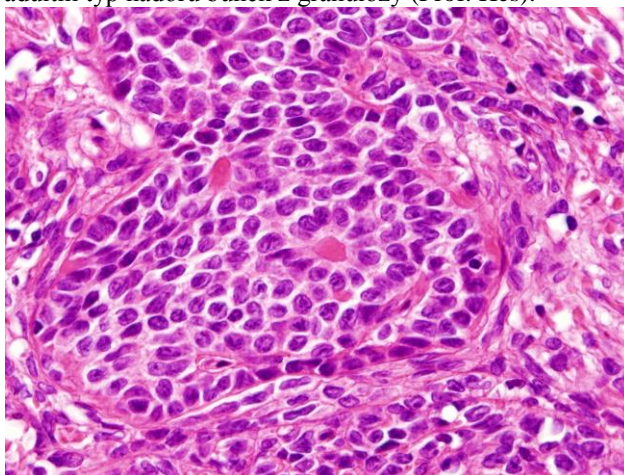
Průměrná velikost tumoru je 9,3cm. Tumory jsou unilaterální s lokálními rozšířeními do okolních tkání (CHUA et al. 2001).

Histologicky jsou tvořeny lehce polymorfními ovoidními buňkami s jadernými zářezy, s Callovými Exnerovými tělísky (<http://www.pathologyoutlines.com/ovarytumor.html#gctadult>). Příklad tohoto nádoru je na obrázku 13.

Tyto tumory mívají velmi stabilní genom (KÖBEL et al. 2009).

K léčbě je obvykle postačující vyoperování nádoru, chemoterapie je potřeba jen v některých případech (ELLOUZE et al. 2006, Zeghal Souki et al. 2011). V roce 2010 byl u tohoto typu nádoru použit anti-angiogenní lék – bevacizumab (BARRENA MEDEL et al. 2010).

**Obrázek 13:** Ovariální adultní typ nádoru buněk z granulózy (Prof. Hes).



### **3.6.2 Testikulární adultní typ nádoru buněk z granulózy**

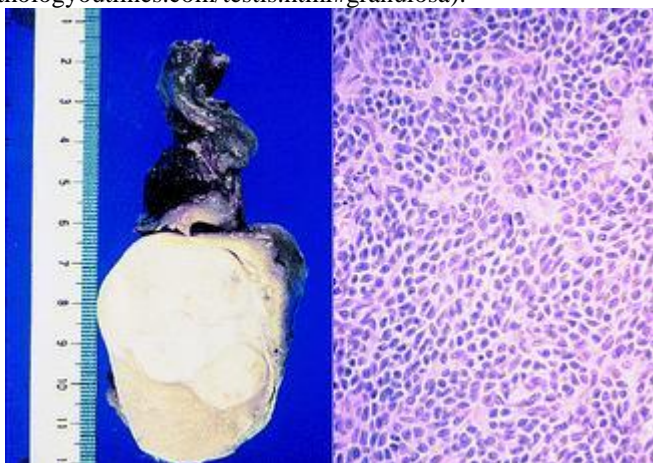
V literatuře je dodnes popsáno jen několik desítek případů tohoto tumoru. Průměrný věk pacientů je 42 let. Klinickým příznakem je gynekomastie ve 20 % případů, ve většině případů je však bezpříznakový (HES et al. 2007).

Morfologicky jsou ATGCT velmi homogenní. Jsou žlutavé barvy. Na řezu jsou solidní nebo cystické, často s pseudokapsulou tvořenou fibrózním parenchymem varlete. Dosahují rozměrů až 13cm. Jsou benigní i maligní s metastázami do regionálních a retroperitoneálních uzlin, jater a kostí (HES et al. 2007).

Histologicky jsou obvykle folikulárního či mikrofolikulárního uspořádání, případně rostou solidně či difuzně. Často obsahují rozetovitě uspořádané buňky kolem kolagenní extracelulární matrix tvořící tzv. „Call-Exner“ tělíska. Buňky mají jádra

s perinukleárními zářezy a výraznými jádérky, neobjemnou cytoplazmou, která neobsahuje mnoho mitochondrií ani hrubého endoplazmatického retikula. Stromální buňky mohou mít světlou či eozinofilní cytoplazmu (HES et al. 2007). Makroskopický i mikroskopický vzhled testikulárního ATGCT je na obrázku 14.

**Obrázek 14:** Testikulární ATGCT. Vlevo: makroskopický obrázek, vpravo: mikroskopický obrázek barvený HE (<http://pathologyoutlines.com/testis.html#granulosa>).



Imunohistochemicky ATGCT pozitivně reaguje s MIC-2, vimentinem, hladkosvalovým aktinem a inhibinem (HES et al. 2007).

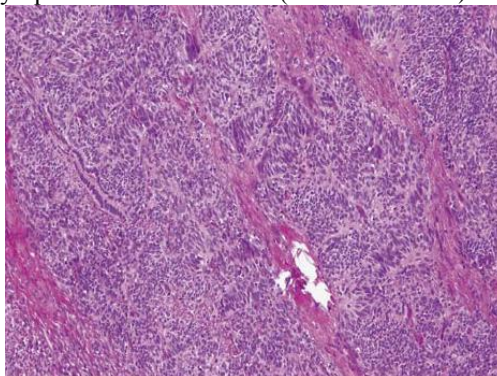
### 3.6.3 Inkompletně diferenciované sex cord gonadální stromální tumory

Skupina těchto nádorů je značně heterogenní, vyskytuje se u všech věkových kategorií, velmi často se vyskytuje v blízkosti „rete testis“ (HES et al. 2007). Byl popsán pouze jeden maligní případ tohoto tumoru, ostatní se chovají zcela benigně (MOSTOFI et al. 1959). Svojí morfologií tvoří jakýsi přechod mezi nádory z Leydigových buněk a Sertoliho buněk (HES et al. 2007).

Histologicky (viz obrázek 15) jsou ISCST tvořeny fibrózně vypadajícími vřetenovitými buňkami s abortivními tubuly, ostrůvky Leydigových buněk či s jinými sex cord strukturami, někdy s ostrůvky epiteloidních buněk. Jádra mívají jaderné zářezy. Nádory z této skupiny, vyskytující se v blízkosti rete testis, bývají tvořené vřetenovitými elementy s objemnou cytoplazmou a s perinukleární vakuolou (HES et al. 2007).

Imunohistochemicky jsou buňky tumoru pozitivní na S-100, hladkosvalový aktin a cytokeratiny AE1-AE3. Tento profil je u jiných druhů tumorů považován za myeloepiteliální (HES et al. 2007).

Obrázek 15: Inkompletně diferenciovaný „sex cord“ gonadální stromální tumor s velkými ovoidními buňkami a lehce eosinofilní cytoplazmou. Barvení HE. (HES et al. 2011)



### 3.6.4 Gen *FOXL2*

*FOXL2* je transkripční faktor typu „winged helix/forkhead“, jehož gen se nachází na 3q23. *FOXL2* je specificky exprimován v očních víčkách a v ovariích, u dospělých osob převážně v ovariích. Má jen jeden exon dlouhý 2,7kb a protein dlouhý 376 AMK. DNA-vazebná doména je dlouhá 100 AMK (CRISPONI et al. 2001). *FOXL2* funguje jako časný marker ovariální diferenciace (COCQUET et al. 2002).

Exprese *FOXL2* je aktivována 12,5 dne po oplození. To je v čase, kdy se u mužů v gonádách objevují pohlavně specifické struktury. *FOXL2* je exprimován v granulózních buňkách časných folikulů ovarií, ale ustává i v pozdějších fázích folikulogeneze. Bylo zjištěno, že mutanty *FOXL2* genu nesnižují v průběhu oogeneze počet zárodečných buněk, primordiálních folikulů ani oocytů, ale drasticky snižují počet kubických granulózních buněk, které jsou potřeba k růstu oocytů. V takovýchto folikulech sice dochází k růstu oocytů, ale rychle to způsobí jejich atrézii. Z tohoto vyplývá, že *FOXL2* je důležitý pro diferenciaci granulózních buněk, které se nemohou kvůli jeho nedostatku přeměnit z dlaždicových na kubické (SCHMIDT et al. 2004).

Již v roce 2002 bylo identifikováno několik mutací tohoto genu vyskytujících se u žen s předčasným ovariálním selháním (HARRIS et al. 2002). Mnoho mutací bylo identifikováno v souvislosti s „blepharomatosis-ptosis-epicanthus inversus syndromem“ (DE BAERE et al. 2003, BEYSEN et al. 2008), což je syndrom asociovaný s předčasným ovariálním selháním, kdy menopauza nastává před 40. rokem života. To doprovází asi 1 až 2% žen (SHELLING 2010). Ve studii z roku 2007 bylo identifikováno celkem 92 mutací, z čehož 34 bylo nových a zbylé byly publikovány

v předešlých studiích. V této studii byla též potvrzena přítomnost dvou „hot spot“ míst pro mutace (BEYSEN et al. 2008, DE BAERE et al. 2001, 2003).

Mutace c.402C>G byla identifikována v souvislosti s ovariálním tumorem buněk z granulózy a nachází se ve „forkhead“ doméně. Záměna aminokyseliny cysteinu za tryptofan (C134W) neruší vazbu FOXL2 na DNA, ale pravděpodobně ruší vazbu s jiným proteinem. Vyskytuje se prakticky u všech případů (97%) adultního typu nádoru buněk z granulózy (a to obvykle v heterozygotním stavu), ale například u thecomy byla identifikována pouze ve 3 případech ze 14. Revizí těchto 3 případů se však objevily malé granulózní komponenty. Kromě jednoho případu, který by mohl být chybně diagnostikovaným ATGCT, se tato mutace nevyskytla ani u juvenilního typu nádoru buněk z granulózy (SHAH et al. 2009). Analýzou 1353 různých nádorových tkání na mutaci *FOXL2* c.402C>G byla zjištěna přítomnost mutace u ATGCT z 94,6% a u 12,5% thecom, ale ne v ostatních tumorech (KIM et al. 2010). Mutace *FOXL2* by tedy mohla sloužit jako marker pro ovariální ATGCT (KÖBEL et al. 2009).

Pokud by se na základě KÖBEL et al. (2009) dalo předpokládat, že thecomy pozitivní na mutace c.402C>G budou obsahovat ložiska ATGCT, mohlo by to mít zásadní vliv na riziko vzniku budoucích malignit u pacienta a tím i na nutnost jeho dlouhodobějšího sledování, popř. úpravu léčebného postupu.

## 4 Materiál a metody

V registru ŠPAÚ a Biopstické laboratoře s.r.o. bylo vybráno vzorků pacientů s TRK k provedení expresní analýzy (viz tabulka 2), 2 zamražené vzorky TRK a 4 zamražené vzorky PRK k provedení metylační analýzy (viz tabulka 3), 2 neidentifikovatelné renální tumory a jeden pseudorozetový karcinom k detekci chromozomálních aberací (viz tabulka 4 a kapitola 4.3.1) a vzorky vzácných tumorů genitálního traktu k detekci mutace c.402C>G u *FOXL2* genu (viz tabulky 5 a 6). Bližší charakteristiky jednotlivých vybraných tumorů jsou v tabulkách 2 – 6 a obecné charakteristiky v přehledu literatury.

### 4.1 Materiál pro analýzu hladin vybraných mRNA genů u TRK

**Tabulka 2:** Charakteristika materiálu pro analýzu hladin vybraných mRNA u tubulocystických renálních karcinomů. N=metastázy nejsou přítomny, P=přítomnost metastáz.

Číslo pacienta	Pohlaví	Věk (roky)	Velikost tumoru (cm)	Přítomnost metastáz
1	Žena	31	5,1	N
2	Muž	29	6,9x5x3,9	N
3	Muž	44	Neznámá	N
4	Muž	60	2,2x1,5x1,5	N
5	Muž	68	2,5	N
6	Muž	68	6,5x4x4	N
7	Muž	58	Neznámá	N
8	Muž	58	Neznámá	P

### 4.2 Materiál pro metylační analýzu u TRK a PRK

**Tabulka 3:** Charakteristika materiálu pro metylační analýzu. TRK = tubulocystický renální karcinom, PRK = papilární renální karcinom. N=metastázy nejsou přítomny, P=přítomnost metastáz.

Označení pacienta	Pohlaví	Věk (roky)	Velikost tumoru (cm)	Přítomnost metastáz
TRK 1	Muž	60	2,2x1,5x1,5	N
TRK 2	Muž	68	6,5x4x4	N
PRK 1	Žena	35	2,5x2,2x1,9	N
PRK 2	Muž	54	3,8x3,1	P
PRK 3	Muž	69	2,5	N
PRK 4	Muž	58	4,9x4,7x4,1	N

### 4.3 Materiál pro aCGH analýzu chr. aberací u vzácných RK

**Tabulka 4:** Materiál pro aCGH. N=metastázy nejsou přítomny, P=přítomnost metastáz.

Označení pacienta	Pohlaví	Věk (roky)	Velikost tumoru (cm)	Přítomnost metastáz
A – pseudorozet.	Žena	25	14x11x4	N
B - neind.	Žena	39	1,3x1,2x2	N
C - neind.	Muž	55	2,7x2,5x4	N

Vzorek A: Nenekrotizující tumor nevrůstající do pánvičky, ani do přiléhající tukové tkáně, sinusů ani hilových struktur. Histologicky se jedná o pseudorozetový karcinom.

Vzorek B: Tumor byl původně diagnostikován pseudorozetový karcinom, avšak po revizi případu, mu byla tato diagnóza odebrána.

Vzorek C: Histologicky byl nalezen neobvyklý, původně zřejmě papilární renální karcinom, který vytváří neobvyklé struktury připomínající až struktury sex-cord tumorů varlete, fokálně vytváří diferenciaci, která se blíží skladbou až tubulárnímu a mucinóznímu vřetenobuněčnému karcinomu ledviny. Tumor nevrůstá do žádné z hilových struktur.

### 4.4 Materiál pro detekci *FOXL2* mutace u genitálních tumorů

#### 4.4.1 ATGCT

**Tabulka 5:** Charakteristika ovariálních a testikulárních ATGCT pro detekci *FOXL2* mutace. N=metastázy nejsou přítomny, P=přítomnost metastáz.

Číslo pacienta	Pohlaví	Věk (roky)	Velikost tumoru (cm)	Přítomnost metastáz
1	Muž	22	5x5x4	N
2	Muž	28	10x9x7	N
3	Muž	37	4x3	N
4	Muž	70	3x2,5x2	N
5	Žena	28	14x10x10	N
6	Žena	73	27x27x18	P
7	Žena	77	8	N

#### 4.4.2 ISCST

**Tabulka 6:** Charakteristika ISCST pro detekci FOXL2 mutace. N=metastázy nejsou přítomny, P=přítomnost metastáz.

Číslo pacienta	Pohlaví	Věk (roky)	Velikost tumoru (cm)	Přítomnost metastáz
8	Muž	61	2	N
9	Muž	57	7x4,5	N
10	Muž	5 měsíců	1	N
11	Muž	1	2,5x2x2	N

### 4.5 Analýza exprese vybraných genů pomocí Real-Time RT PCR

#### 4.5.1 Výběr genů pro analýzu Real-Time RT PCR

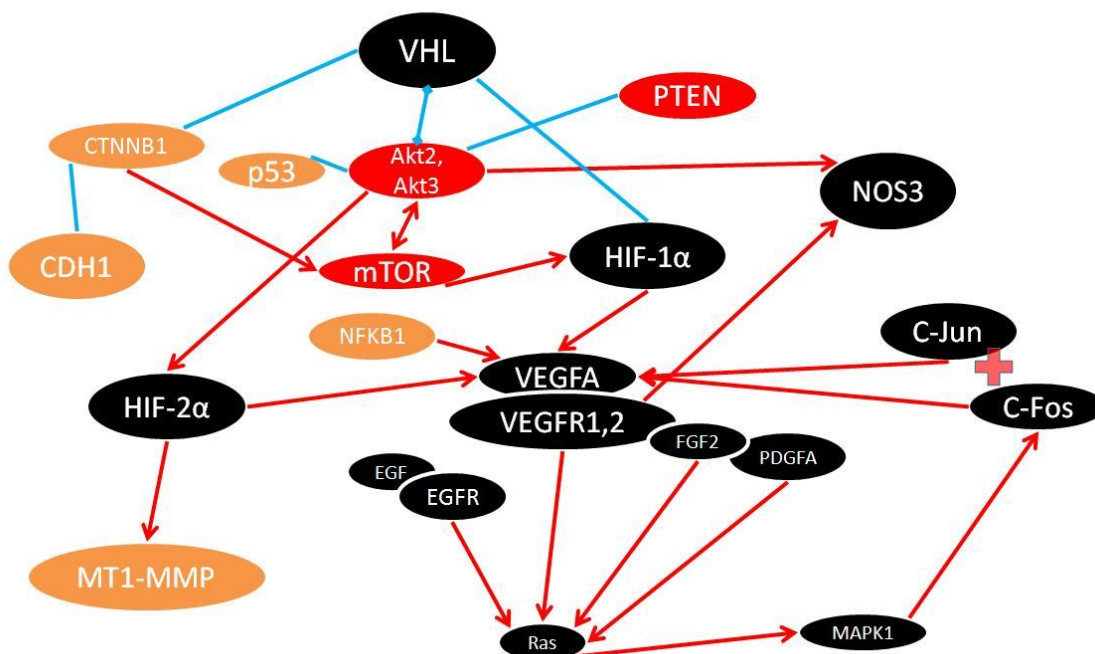
Výběr genů byl proveden na základě dostupné literatury (např. WEINBERG 2007, KAPOOR 2009, MORAIS et al. 2009, TREBEC-REYNOLDS et al. 2010, PINTO MARÍN et al. 2010) a programu „Pathway Studio Ariadne“ (Ariadne Genomics, Maryland, USA). Cílem bylo popsat změny hladin mRNA genů signálních drah souvisejících s angiogenní aktivitou, jež jsou cílem antiangiogenních terapeutik. Nejdůležitější vztahy mezi vybranými geny shrnuje obrázek 16.

Referenční geny *ACTB*, *HMBS* a *G6PD* byly vybrány na základě aplikace přístupné na stránkách <https://www.genevestigator.com/gv/> a z dostupné literatury (např. GLENN et al. 2007, NYHAN et al. 2010) Vzhledem k chybné amplifikaci *HMBS* a *G6PD* u některých vzorků byl pro výpočty použit pouze *ACTB*, který vycházel podle GLENN et al. (2007) jako jeden z nejstabilněji exprimovaných genů při analýze renální tkáně s materiálem z parafinových bloků.



**Obrázek 16:** Vztahy mezi geny vybranými pro analýzu jejich exprese pomocí Real-Time RT PCR. Červené šipky znamenají pozitivní regulaci, modré čáry znamenají negativní regulaci. Červeně jsou značené geny reprezentující PI3K/Akt/mTOR dráhu, černě geny reprezentující RTK/MAPK dráhu a oranžově ostatní geny.

## Vztahy mezi vybranými geny



### 4.5.2 Odparafinování tkáňových bloků

Parafinové bloky byly nakrájeny na několik 15µm tlustých řezů, rozděleny na nádorovou a nenádorovou část za kontroly HE barvených preparátů. Řezy byly poté vloženy do 1,5ml mikrozkušavek. Následovalo odparafinování pro izolaci DNA nebo RNA.

Ke tkáni bylo přidáno 2x 1ml xylenu, mikrozkušavka byla krátce vortexována, inkubována při 50°C 3min. a centrifugována při 11000 x g 3min. Poté bylo 2x přidáno 1ml 96% etanolu, mikrozkušavka byla krátce vortexována, centrifugována při 11000 x g 3 minuty a byl odsát supernatant. Poté byla centrifugována při 11000 x g 3minuty a inkubována 50°C /30 minut při otevřeném víčku.

### 4.5.3 Izolace RNA

RNA byla izolována soupravou „HIGH PURE RNA PARAFFIN KIT“ (Roche applied science, Basel, Švýcarsko). Princip této soupravy spočívá v navázání

nukleových kyselin na skelný povrch filtru v přítomnosti chaotropních solí a následném promývání od nečistot. Postup byl proveden dle pokynů výrobce.

Ke vzorku bylo přidáno 100 $\mu$ l lyzačního pufru, 16 $\mu$ l 10% SDS a 40 $\mu$ l proteinázy K. Tato směs byla promíchána (vortex) a inkubována při 55°C přes noc. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 325 $\mu$ l „Binding buffer“ a 325 $\mu$ l 96% etanolu, zkumavka byla promíchána a obsah byl přenesen do kolonky s filtrem, centrifugován 30sek při 8000 x g., odstraněn filtrát a kolonka centrifugována 2min při 16000 x g. Poté bylo přidáno 500 $\mu$ l promývacího roztoku I, centrifugováno 30sek. při 8000 x g a odstraněn filtrát. Poté bylo přidáno 500 $\mu$ l promývacího roztoku II, centrifugováno 30s. při 8000 x g, odstraněn filtrát a bylo přidáno ještě 300 $\mu$ l promývacího roztoku II, centrifugováno 30s. při 8000 x g a odstraněn filtrát. Poté bylo centrifugováno 2min. při 16000 x g pro vysušení filtru. Filtr byl vložen do 1,5ml zkumavky, poté bylo přidáno 90 $\mu$ l elučního pufru, centrifugováno 1min. při 8000 x g a vyhozen filtr. Do eluátu se přidalo 10 $\mu$ l DNase inkubačního pufru, 1 $\mu$ l DNázy I, krátce bylo zvortexováno a necháno inkubovat 45min. při 37°C. Poté bylo přidáno 20 $\mu$ l lyzačního pufru, 18 $\mu$ l 10% SDS a 40 $\mu$ l proteinázy K a nechalo se inkubovat 60min při 55°C. Poté bylo přidáno 325 $\mu$ l „Binding buffer“ a 325 $\mu$ l 96% etanolu, promícháno nasátím pipety, přepipetováno do kolonky s filtrem, centrifugováno 30sek. při 8000 x g, odstraněn filtrát a následně centrifugováno 2min při 16000 x g. Poté bylo přidáno 500 $\mu$ l promývacího roztoku I, centrifugováno 30sek při 8000 x g a odstraněn filtrát. Poté bylo přidáno 500 $\mu$ l promývacího roztoku II, centrifugováno 30sek. při 8000 x g, odstraněn filtrát a následně bylo přidáno 300 $\mu$ l promývacího roztoku II, centrifugováno 30sek. při 8000 x g a byl odstraněn filtrát. Poté bylo centrifugováno 2min při 16000 x g. Filtr byl přenesen do 1,5ml zkumavky, bylo přidáno 60 $\mu$ l elučního pufru a centrifugováno 1 min při 8000 x g.

Koncentrace a čistota RNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop (Nanodrop 1000 Spectrofotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Všechny centrifugace byly provedeny na centrifuze Eppendorf 5430 (Hamburk, Německo).

#### **4.5.4 Reverzní transkripce**

Reverzní transkripce byla provedena pomocí soupravy „First Strand DNA Synthesis kit“ (Roche, Basel, Švýcarsko) dle pokynů výrobce:

Byla připravena směs primerů a RNA dle tabulky 7.

**Tabulka 7:** Příprava roztoku, 1. krok reverzní transkripce.

<b>Reagencie</b>	<b>Množství na 1 vzorek (μl)</b>	<b>Množství na pozitivní kontrolu (μl)</b>
Random hexamer primer (60μM)	2,00	2,00
Destilovaná voda	0,00	7,00
Množství izolované RNA (500ng)	11,00	4,00

Poté bylo inkubováno 10 min. při 65°C (cycler Multigene Mini, Labnet, International, Edison, USA)

Následně bylo přidáno 7μl PCR master mixu (příprava viz tabulka 8)

**Tabulka 8:** Příprava mixu pro 2. krok reverzní transkripce.

<b>Reagencie</b>	<b>Množství na 1 reakci (μl)</b>
Reaction Buffer	4,00
Protector RNase Inhibitor (40U/μl)	0,50
dNTPs (1mM každý)	2,00
Reverzní transkriptáza (20U/μl)	0,50

Poté byla provedena vlastní reverzní transkripce: inkubace 10min. při 25°C, 30min. při 55°C, 5min. při 85°C a po skončení se vzorek uchovával při 4°C (cycler Multigene Mini, Labnet Internationale).

Z každého vzorku RNA byly paralelně připraveny vždy 4 reverzní transkripce (celkový objem jedné reakce = 20μl).

#### **4.5.5 Kontrola kvality cDNA**

Za účelem kontroly integrity získané cDNA byla provedena PCR, kde byly primery na geny beta-2-mikroglobulin (*B2M*) a fosfoglycerol kinázu (*PGK*) navržené na okraje exonů a kontaminace DNA se projevila na gelu jako proužek o větší délce než proužek vzniklý amplifikací samotné cDNA. Do Real-Time RT PCR reakce byly

vybrány pouze vzorky, které měly integritu alespoň 133bp a nebyla u nich detekována kontaminující DNA.

Názvy genů pro navržené primery, délka jejich ampliconů a sekvence primerů jsou shrnuty v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Sekvence použitých primerů pro PCR – kontrolní geny, RNA.

Název primeru	Velikost ampliconu (bp)	Sekvence forward primeru	Sekvence reverse primeru
B2M	105	GAAAAAGATGAGTATGCCT G	ATCTTCAAACCTCCATGATG
B2M – 133	133	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC T	TGTCGGATTGATGAAACCCA G
PGK	247	CAGTTTGGAGCTCCTGGAA G	TGCAAATCCAGGGTGCAGTG

Reakce byla připravena podle tabulky 10.

**Tabulka 10:** Příprava reakce pro PCR – kontrolní geny RNA.

Reagencie	Množství na jednu reakci (μl)
Fast Start Master mix	12,50
Primer mix (10 pmol každého primeru)	4,00
cDNA	2,00
H <sub>2</sub> O	6,50
Celkem	25

Zkumavky se směsí byly vloženy do cycleru na program znázorněný v tabulce 11.

**Tabulka 11:** Program v cycleru pro PCR – kontrolní geny RNA.

Program	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubace	1	95	14:00
Denaturace	45	95	01:00
Annealing		60	00:30
Extenze		72	01:00
Finální extenze	1	72	07:00
Hold	1	04	∞

Poté byla specifita produktů zkontrolována na 2% agarózovém gelu a podle zjištěné integrity byly vzorky použity pro další analýzu, popř. vyřazeny jako neanalyzovatelné (po stejném výsledku při 2x opakované izolaci).

#### 4.5.6 Real-Time RT PCR

Byl využit detekční systém využívající UPL hydrolyzačních sond dlouhých 8-9 nukleotidů s inkorporovanými peptidovými nukleovými kyselinami, konkrétně systém RealTime Ready od firmy Roche.

Tato souprava obsahuje reakční destičku s 96 jamkami. Každá jamka obsahuje pár PCR primerů a UPL sondu, značenou na 5' konci fluoresceinem a na 3' konci zhášecem fluorescence, k vybraným 24 cílovým a 3 referenčním „housekeeping“ genům (viz obrázek 17). Expze každého genu byla stanovena v triplicátu. Sekvence použitých primerů ke konkrétním genům jsou spolu s délkami ampliconů a vypočtenou „efficiency“ k nalezení v tabulce 14.

**Obrázek 17:** Schéma destiček Real-Time Ready použitých při analýze expze daných genů se zkratkami použitých genů.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	HIF1A <i>H. sapiens</i>	EPAS1 <i>H. sapiens</i>	VEGFA <i>H. sapiens</i>	ACTB <i>H. sapiens</i>	HIF1A <i>H. sapiens</i>	EPAS1 <i>H. sapiens</i>	VEGFA <i>H. sapiens</i>	ACTB <i>H. sapiens</i>	HIF1A <i>H. sapiens</i>	EPAS1 <i>H. sapiens</i>	VEGFA <i>H. sapiens</i>	ACTB <i>H. sapiens</i>
<b>B</b>	FLT1 <i>H. sapiens</i>	KDR <i>H. sapiens</i>	HRAS <i>H. sapiens</i>	G6PD <i>H. sapiens</i>	FLT1 <i>H. sapiens</i>	KDR <i>H. sapiens</i>	HRAS <i>H. sapiens</i>	G6PD <i>H. sapiens</i>	FLT1 <i>H. sapiens</i>	KDR <i>H. sapiens</i>	HRAS <i>H. sapiens</i>	G6PD <i>H. sapiens</i>
<b>C</b>	MAPK1 <i>H. sapiens</i>	FOS <i>H. sapiens</i>	JUN <i>H. sapiens</i>	HMBS <i>H. sapiens</i>	MAPK1 <i>H. sapiens</i>	FOS <i>H. sapiens</i>	JUN <i>H. sapiens</i>	HMBS <i>H. sapiens</i>	MAPK1 <i>H. sapiens</i>	FOS <i>H. sapiens</i>	JUN <i>H. sapiens</i>	HMBS <i>H. sapiens</i>
<b>D</b>	NOS3 <i>H. sapiens</i>	MTOR <i>H. sapiens</i>	AKT2 <i>H. sapiens</i>	C+	NOS3 <i>H. sapiens</i>	MTOR <i>H. sapiens</i>	AKT2 <i>H. sapiens</i>	C+	NOS3 <i>H. sapiens</i>	MTOR <i>H. sapiens</i>	AKT2 <i>H. sapiens</i>	C+
<b>E</b>	AKT3 <i>H. sapiens</i>	PTEN <i>H. sapiens</i>	PDGFA <i>H. sapiens</i>	C+	AKT3 <i>H. sapiens</i>	PTEN <i>H. sapiens</i>	PDGFA <i>H. sapiens</i>	C+	AKT3 <i>H. sapiens</i>	PTEN <i>H. sapiens</i>	PDGFA <i>H. sapiens</i>	C+
<b>F</b>	EGF <i>H. sapiens</i>	EGFR <i>H. sapiens</i>	FGF2 <i>H. sapiens</i>	C+	EGF <i>H. sapiens</i>	EGFR <i>H. sapiens</i>	FGF2 <i>H. sapiens</i>	C+	EGF <i>H. sapiens</i>	EGFR <i>H. sapiens</i>	FGF2 <i>H. sapiens</i>	C+
<b>G</b>	MMP14 <i>H. sapiens</i>	TP53 <i>H. sapiens</i>	VHL <i>H. sapiens</i>	C-	MMP14 <i>H. sapiens</i>	TP53 <i>H. sapiens</i>	VHL <i>H. sapiens</i>	C-	MMP14 <i>H. sapiens</i>	TP53 <i>H. sapiens</i>	VHL <i>H. sapiens</i>	C-
<b>H</b>	NFKB1 <i>H. sapiens</i>	CTNNB1 <i>H. sapiens</i>	CDH1 <i>H. sapiens</i>	C-	NFKB1 <i>H. sapiens</i>	CTNNB1 <i>H. sapiens</i>	CDH1 <i>H. sapiens</i>	C-	NFKB1 <i>H. sapiens</i>	CTNNB1 <i>H. sapiens</i>	CDH1 <i>H. sapiens</i>	C-

PCR byla provedena dle postupu:

Byla naředěna cDNA, aby 1μl cDNA odpovídal koncentraci 20ng,

poté byl připraven PCR master mix na všech 96 jamek (v praxi na 110 reakcí kvůli rezervě) dle tabulky 12 v závěru této kapitoly.

**Tabulka 12:** Příprava reakce pro Real-Time PCR.

Reagencie:	Množství na 1 reakci (μl)
Light cycler 480 probe master	10
cDNA (20ng)	1
H <sub>2</sub> O	9

Poté byl master mix rozpipetován po 20μl do každé jamky, destička byla přelepena folií a byla provedena vlastní RealTime PCR dle programu v tabulce 13 (light cycler 480).

**Tabulka 13:** Program v Light-Cycleru pro Real-Time PCR.

Program:	Teplota (°C)	Čas (min.)	Ramp rate (°C/s)	Počet cyklů
Preinkubace	95	10:00	4,4	1
Amplifikace	95	00:10	4,4	65
	60	00:30	2,2	
	72	00:01	4,4	
Ochlazení	40	00:30	2,2	1

Délka PCR byla ověřena na 2% agarózovém gelu elektroforézou.

Všechny centrifugace byly provedeny na centrifuze Eppendorf 5430.

#### 4.5.7 Statistické zpracování dat

Data byla analyzována dle postupu publikovaného v článku (PFAFFL 2001). Tento výpočet pracuje s hodnotami Ct každého vzorku a s hodnotami PCR „efficiency“ každého páru primerů. Hodnoty Ct byly pro každý vzorek odečteny ze LightCycler Software 1.5 (Roche) a hodnoty PCR „efficiency“ byly spočítány z hrubých křivek pomocí programu LinReg (RUIJTER et al. 2009). Z analýzy byly vyloučeny reakce, u kterých byla zjištěna Ct hodnota vyšší než 45 cyklů, reakce, kde se Ct hodnoty jednotlivých triplikátů lišily o více než 0,5 cyklu a reakce, kde ve dvou reakcích z triplikátu nevznikl žádný produkt. Ct hodnoty pro každý triplikát byly zprůměrovány.

Nejdříve bylo množství cílové mRNA vztaženo k množství mRNA referenčního genu v každém vzorku. Tomuto poměru říkáme „Ratio“ hodnota. Takto získané „Ratio“ hodnoty byly statisticky vyhodnoceny použitím „Wilcoxon Exact test“ v programu Statistica (StatSoft, Tulso, Oklahoma, USA).

**Tabulka 14:** Názvy genů použité v destičce, sekvence použitých primer, jejich „efficiency“ a délky jednotlivých ampliconů. DA= délka ampliconu, Eff.= „efficiency“

Gen	Forward primer	Reverse Primer	DA	Eff.
HIF1A	TGGAATGGAGCAAAAAGACAA	CAGCTGTGGTAATCCACTTTCA	94	1,853
EPAS1	AATCAGCTTCTGCGAACAC	GCTTCGGACTCGTTTTGAGA	63	1,821
VEGFA	TTAAACGAACGTACTTGCAGATG	GAGAGATCTGGTCCCGAAA	93	1,823
FLT1	GCATACCTCACTGTTCAAGGAA	GCCACACAGGTGCATGTTAG	74	1,776
KDR	CCAAATTATCTCCATCTTTGGTG	AGCCTTCAGATGCCACAGAC	69	1,845
HRAS	GCTCTCCTGACGCAGCAC	CTTGCTCCGTCTTCCTT	94	1,861
MAPK1	CACACAGGGTTCCTGACAGA	ATATCAATGGACTTGGTGTAGCC	95	1,840
FOS	GGGGCAAGGTGGAACAGT	TTCCCTTCGGATTCTCCTT	60	1,663
JUN	AGTCAGGCAGACAGACAGACAC	AAAATAAGATTTGCAGTTCGGACTAT	71	1,832
NOS3	GCATCCCTACTCCCACCAG	TTCTTCACACGAGGGAACTTG	92	1,825
MTOR	GCACCATCAACTCCAAAA	CCATTCCAGCCAGTCATCTT	68	1,811
AKT2	CTCACACAGTCACCGAGAGC	TGGGTCTGGAAGGCATACTT	82	1,846
AKT3	TGGATTTACCTTATCCCTCAA	TGGCTTTGGTCGTTCTGTTT	74	1,797
PTEN	GCTACCTGTTAAAGAATCATCTGGA	CTGGCAGACCACAACTGAG	122	1,856
PDGFA	CACGAGCAGTGTCAAGTGC	TCTAACCTCACCTGGACTTCTTTTA	114	1,601
EGF	CCTCAGATGGGAAAACGTG	GTTCTTTAGATCAACTTCACCACCT	74	1,772
EGFR	CAGCCACCCATATGTACCATC	AACTTTGGGCGACTATCTGC	80	1,815
FGF2	TTCTTCTGCGCATCCAC	TTCTGCTTGAAGTTGTAGCTTGAT	87	1,766
MMP14	CAGGAATGAGGATCTGAATGG	CCGAGGGGTCACTGGAAT	95	1,895
TP53	AGGCCTTGGAACTCAAGGAT	CCCTTTTTGGACTTCAGGTG	85	1,836
VHL	GCCCATTAGAGAAGTATTTATCAGGAG	CATACAAGCTGTCCTGACTTACTAGG	74	1,846
NFKB1	CTGGCAGCTCTTCTCAAAGC	TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA	71	1,737
CTNNB1	TTGGATATCGCCAGGATGAT	CATGGGGTCCATACCCAAG	83	1,659
CDH1	GGCCAGGAAATCACATCCTA	GGCAGTGTCTCTCAAATCC	87	1,850
ACTB	GGCCAGGTCATCACCATT	GGATGCCACAGGACTCCAT	91	1,692
G6PD	TCCATCAGTCGGATACACACA	CACCAGATGGTGGGGTAGAT	85	----
HMBS	TGCCCTGGAGAAGAATGAAG	CAGCATCATGAGGGTTTTCC	119	----

## **4.6 Analýza metylace**

### **4.6.1 Izolace DNA**

Pro vlastní izolaci byl použit Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Princip této soupravy spočívá v navázání nukleových kyselin na silikátový povrch filtru v přítomnosti chaotropních solí a následném promývání od nečistot.

Po usušení řezů bylo ke vzorkům přidáno 180 $\mu$ l T1 pufru a 25 $\mu$ l proteinázy K, promícháno (vortex) a inkubováno při 56°C přes noc. Poté bylo přidáno 10 $\mu$ l proteinázy K a 200 $\mu$ l B3 pufru, promícháno a inkubováno po 70°C/10min. a opět promícháno. Poté bylo přidáno 210  $\mu$ l 96% etanolu, zvortexováno, přeneseno do kolonky s filtrem, centrifugováno 11000 x g/1min. a byl odstraněn filtrát. Poté bylo přidáno 500 $\mu$ l BW pufru, centrifugováno 11000 x g/1min., odstraněn filtrát, přidáno 600 $\mu$ l B5 pufru, centrifugováno 11000 x g/1min., odstraněn filtrát a ještě centrifugováno 11000 x g/1min. Nakonec byla kolonka přenesena do čisté 1,5ml zkumavky, bylo přidáno 100 $\mu$ l EB pufru předehřátého na 70°C, inkubováno 1 minutu a centrifugováno při 11000 x g/1min.

Koncentrace a čistota získané DNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop (Nanodrop 1000 Spectrofotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Všechny centrifugace byly provedeny na centrifuze Eppendorf 5430 (Hamburk, Německo).

### **4.6.2 PCR (kontrolní geny po izolaci DNA)**

Pro tuto PCR byly použity primery podle publikace van DONGEN et al. (2003). Jedná se o primery (viz tabulka 15), jejichž amplikony jsou zvětšující se délky. Na základně počtu amplikonů a jejich délky lze usuzovat na integritu vyizolované DNA.



**Tabulka 15:** Použité primery pro PCR – kontrolní geny, DNA.

<b>Gen</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Délka (bp)</b>
<i>Tbxas1</i>	GCCCGACATTCTGCAAGTCC	GGTGTTGCCGGAAGGGTT	<b>100</b>
<i>Rag1</i>	TGTTGACTCGATCCACCCCA	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA	<b>200</b>
<i>Plzf</i>	TGCGATGTGGTCATCATGGTG	CGTGTCATTGTCTGAGGC	<b>300</b>
<i>AF4</i> exon 11	CCGCAGCAAGCAACGAACC	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC	<b>400</b>
<i>AF4</i> exon 3	GGAGCAGCATTCCATCCAGC	CATCCATGGGCCGGACATAA	<b>600</b>

Nejprve byl připraven PCR master mix podle tabulky 16.

**Tabulka 16:** Příprava master mixu pro PCR – kontrolní geny, DNA.

<b>Reagencie</b>	<b>Množství na jednu reakci (μl)</b>
Fast Start Master Mix	10
25mM roztok Mg <sup>2+</sup>	0,4
Primer mix (10 pmol každé primeru)	0,48
H <sub>2</sub> O	7,12
DNA	2 (100ng)

Vzniklý mix byl vložen do cycleru na program zobrazený v tabulce 17.

**Tabulka 17:** Program v cycleru pro PCR – kontrolní geny, DNA.

<b>Program</b>	<b>Počet cyklů</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (min.)</b>
Aktivace	1	95	14:00
Denaturace	35	95	01:00
Annealing		60	01:00
Extenze		72	01:30
Finální extenze	1	72	07:00
Hold	1	04	∞

Poté byla specifita produktů zkontrolována na 2% agarózovém gelu a podle zjištěné integrity vzorku byly vzorky použity pro další analýzu, popř. vyřazeny (pokud měly integritu horší než 200 bp) jako neanalyzovatelné (po stejném výsledku při 2x opakované izolaci).

### 4.6.3 Metylační analýza

V této metodě byl využit Methyl-Profiler™ DNA Methylation PCR Array System (QIAGEN, Hilden, Německo), konkrétně panel 24 tumor supresorových genů. Tento systém je založen na rozštěpení promotoru genu metylačně senzitivní restriktázou (štěpení nemetylované a částečně metylované DNA) a restriktázou závislé na metylaci (štěpení jen metylované DNA). Poté je zbylá DNA kvantifikována pomocí Real-Time PCR za použití primerů zasahujících do promotoru daného genu. Množství hypermetylované nebo nemetylované DNA je určeno porovnáním s reakcí, kde nebyl použit žádný enzym ([http://www.sabiosciences.com/dna\\_methylation.php](http://www.sabiosciences.com/dna_methylation.php)).

Postup byl proveden podle pokynů výrobce.

Nejprve byl připraven premix za použití soupravy Methyl-Profiler™ Enzyme Kit (QIAGEN, Hilden, Německo) podle tabulky 18.

**Tabulka 18:** Příprava premixu pro přípravu štěpných reakcí.

Reagencie	Množství na 1 reakci (μl)
5x Digestion Buffer	26
DNA	X (1μg)
H <sub>2</sub> O	120-(26+X)
Celkový objem	120

Poté byly podle tabulky 19 připraveny 4 štěpné reakce.

**Tabulka 19:** Příprava štěpných reakcí.

Reagencie	Mo (μl)	Ms (μl)	Md (μl)	Msd (μl)
H <sub>2</sub> O	2	1	1	-
Reakční mix	28	28	28	28
Enzym A	-	1	-	1
Enzym B	-	-	1	1
Celkový objem	30	30	30	30

Štěpné reakce byly promíchány, inkubovány 37°C/6hod. a poté inaktivovány při 65°C/20min. Následně byly připraveny master mixy pro Real-Time PCR (viz tabulka 20) za použití celého objemu restriktčních reakcí připravených v předchozím kroku za použití soupravy PA – 012 (Applied Biosystems, Johnson, Iowa, USA).

**Tabulka 20:** Příprava mixů pro Real-Time PCR.

Reagencie:	Mo (μl)	Ms (μl)	Md (μl)	Msd (μl)
H <sub>2</sub> O	300	300	300	300
PCR Master Mix Solution	330	330	330	330
Mo digest	30	-	-	-
Ms digest	-	30	-	-
Md digest	-	-	30	-
Msd digest	-	-	-	30
Celkový objem	660	660	660	660

Vzniklé roztoky byly promíchány (vortex) a krátce centrifugovány při 500 x g/10sek..

Poté bylo napipetováno 25μl do každé jamky v destičce podle obrázku 18.

**Obrázek 18:** Schéma k napipetování mixu pro metylační analýzu přímo s vloženými umístěními pro jednotlivé tumor-supresorové geny. (převzato z manuálu Methyl Profiler DNA Methylation PCR Array System dostupného na <http://www.sabiosciences.com/>)

Digest	Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M <sub>o</sub>	A	APC A01	BRCA1 A02	CDH1 A03	CDH13 A04	CDKN2A A05	DAPK1 A06	ESR1 A07	FHIT A08	GSTP1 A09	HDXA1 A10	IGF2 A11	MGMT A12
	B	MLH1 B01	NEUROG1 B02	PDLIM4 B03	PTEN B04	RARB B05	RASSF1 B06	RUNX3 B07	SODCS1 B08	TIMP3 B09	TP73 B10	VHL B11	WIF1 B12
M <sub>s</sub>	C	APC C01	BRCA1 C02	CDH1 C03	CDH13 C04	CDKN2A C05	DAPK1 C06	ESR1 C07	FHIT C08	GSTP1 C09	HDXA1 C10	IGF2 C11	MGMT C12
	D	MLH1 D01	NEUROG1 D02	PDLIM4 D03	PTEN D04	RARB D05	RASSF1 D06	RUNX3 D07	SODCS1 D08	TIMP3 D09	TP73 D10	VHL D11	WIF1 D12
M <sub>d</sub>	E	APC E01	BRCA1 E02	CDH1 E03	CDH13 E04	CDKN2A E05	DAPK1 E06	ESR1 E07	FHIT E08	GSTP1 E09	HDXA1 E10	IGF2 E11	MGMT E12
	F	MLH1 F01	NEUROG1 F02	PDLIM4 F03	PTEN F04	RARB F05	RASSF1 F06	RUNX3 F07	SODCS1 F08	TIMP3 F09	TP73 F10	VHL F11	WIF1 F12
M <sub>sd</sub>	G	APC G01	BRCA1 G02	CDH1 G03	CDH13 G04	CDKN2A G05	DAPK1 G06	ESR1 G07	FHIT G08	GSTP1 G09	HDXA1 G10	IGF2 G11	MGMT G12
	H	MLH1 H01	NEUROG1 H02	PDLIM4 H03	PTEN H04	RARB H05	RASSF1 H06	RUNX3 H07	SODCS1 H08	TIMP3 H09	TP73 H10	VHL H11	WIF1 H12

Po napipetování celé destičky byla destička přelepena fólií a vložena do přístroje ABI 7900HT (Applied Biosystems) na program zobrazený v tabulce 21.

**Tabulka 21:** Program pro ABI 7900HT.

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min.)
1	95	10:00
3	99	00:30
	72	01:00
40	97	00:15
	72	01:00

Po provedení analýzy byly exportovány Ct hodnoty, které byly následně importovány do Excelového sešitu staženého z <http://www.sabiosciences.com/>. Tím bylo získáno procentuální zhodnocení metylace k jednotlivým genům. Tato data byla použita k vytvoření klastrových analýz na stránkách

[http://www.sabiosciences.com/dna\\_methylation\\_heatmap.php](http://www.sabiosciences.com/dna_methylation_heatmap.php).

Všechny centrifugace byly provedeny na centrifuze Eppendorf 5430.

## **4.7 Array-CGH analýza**

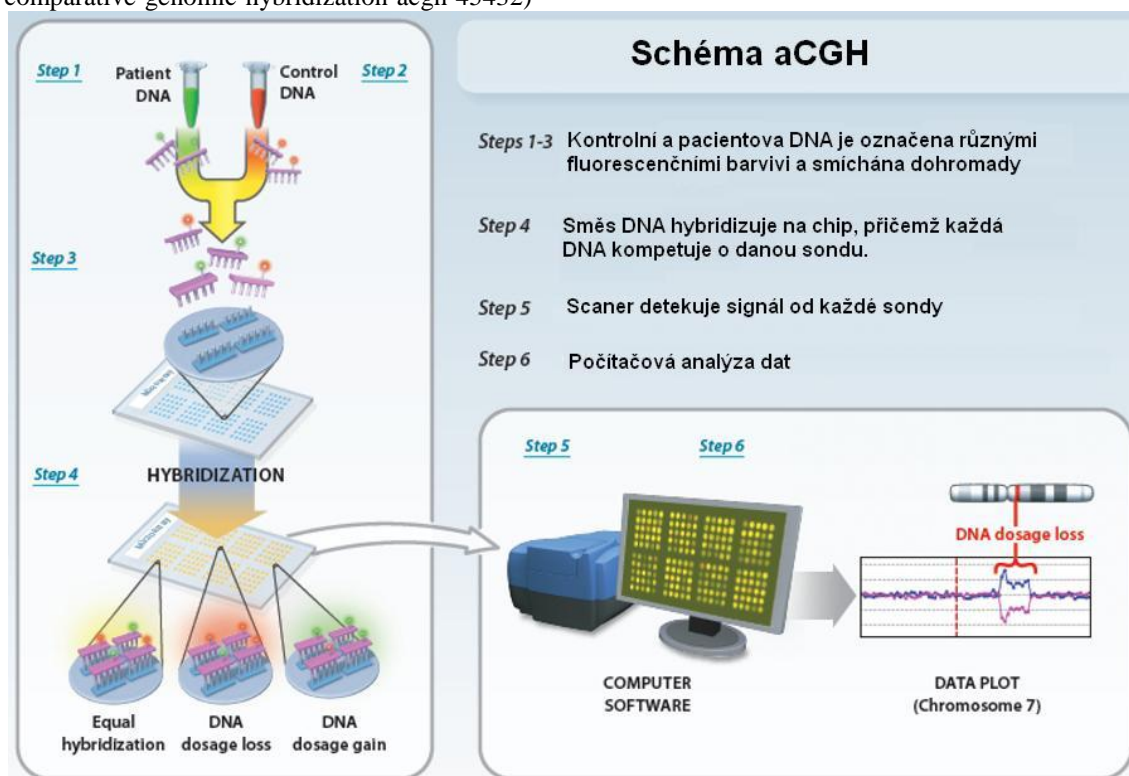
### **4.7.1 Izolace DNA a PCR kontrolních genů**

Izolace DNA a PCR pro kontrolní geny byly provedeny podle postupů uvedených v kapitolách 4.6.1 a 4.6.2.

### **4.7.2 Princip a postup metody aCGH**

Array CGH je metoda určená pro zjištění variací počtu kopií ve vyšším rozlišení než starší CGH založená na hybridizaci k metafázickým chromozomům. DNA z testovaného a referenčního vzorku jsou označeny rozdílnými fluorofory a hybridizovány na sondy. Sondy jsou odvozeny z většiny známých genů a nekódujících regionů genomu, připevněných na sklíčko. Poměr intenzit fluorescenčních signálů je poté použit pro výpočet chromozomálních změn pro daný úsek genomu (PFEIFER 2006). Princip je zachycen na obrázku 19.

**Obrázek 19:** Zjednodušené schéma aCGH. (<http://www.nature.com/scitable/topicpage/microarray-based-comparative-genomic-hybridization-acgh-45432>)



2 $\mu$ g DNA byly ředěny do 80  $\mu$ l H<sub>2</sub>O a poté sonikovány s 10% amplitudou a pulsy 0,5on a 0,5off po dobu 10sek. na sonikátoru Bransor 450. (Branson, Danbury, Connecticut, USA) 1 $\mu$ g sonikované DNA bylo smícháno se značenými heptamery (Trilink Biotechnologies, San Diego, Californie, USA), pro nádorovou DNA značenou Cy3 a pro referenční DNA značenou Cy5 (pro rozetový tumor byla jako referenční DNA použita komerční Human Genomic DNA, Male [Promega, Madison, Winsconsin, USA], pro neklasifikovatelné tumory byla jako referenční DNA použita zdravá tkáň těchto pacientů). Poté byly vzorky denaturovány a inkubovány při 37°C/2 hodiny v cycleru s dNTP/Klenow Master Mixem (Roche NimbleGen Inc., Madison, Wisconsin, USA) při použití 100 jednotek Klenowova fragmentu (NEB, Ipswitch, Massachusetts, USA). Reakce byla zastavena přidáním 0,5M EDTA a vzorek purifikován izopropanolovou precipitací. Poté bylo smícháno 6 $\mu$ g od každého vzorku, vysušeno a resuspendováno v 5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

Vzorky byly poté hybridizovány MAUI Hybridizačním systémem (BioMicro, Salt Lake City, Utah, USA) při použití mixéru NimbleChip X1 a čipu NimbleGen 385K Human CGH WG-T v2.0, build: HG18, NCBI 36, s odstupem sond 7073bp (Roche

NimbleGen). Hybridizační mix byl připraven pomocí NimbleGen Hybridizačního Kitu dle pokynů výrobce. Připravená hybridizační směs byla na čipu hybridizována při 42°C/20 hodin. Na promývání byly použity pufrы NimbleGen. Čipy byly skenovány s rozlišením 3µm pomocí InnoScan 700 (Innopsys, Carbone, Francie).

Analýza obrázků a vzniklých dat byla provedena pomocí NimbleScan 2.5 (Roche NimbleGen, Mannheim, Německo) CGH-segMNT analýzou. Nejprve byla provedena normalizace dat „qspline“, kterou byly vykompenzovány rozdíly mezi signály sond. „SeqMNT“ algoritmus poté mohl identifikovat změny počtu chromozomů dynamickým mapováním, které minimalizovalo chyby průměrných hodnot. Následovalo identifikování bodů zlomu a určení počtu segmentů do výsledků. Minimální log<sub>2</sub> segmentální rozdíl pro identifikaci dvou segmentů byl nastaven na 0,1. Za minimální délku segmentů byly považovány dvě sondy. Maximální kritérium pro výběr hranic segmentů bylo nastaveno na 0,9999. Nezprůměrovaná segmentace a 10x snížené průměrné okno bylo aplikováno na hrubá data, čímž bylo dosaženo vzdáleností 7000bp a 70000bp. Výsledky byly exportovány ve formátech umožňujících další analýzu v programu SignalMap (Roche NimbleGen).

Cut-off hodnoty byly nastaveny v log<sub>2</sub> měřítku na -0,193 pro ztráty a 0,170 pro zisk.

### 4.7.3 LOH

Výsledky aCGH pro pseudorozetové RCC byly potvrzeny LOH analýzou s použitím markerů D1S199 a D1S234 pro potvrzení 1p36del a D22S420, D22S539, D22S315, D22S280, D22S283, D22S423 a D22S274 pro monosomii 22q. Byl použit ABI Prism<sup>®</sup> Linkage Mapping Set (Applied Biosystems podle upraveného postupu).

Nejprve byla izolována DNA a s tou provedena PCR na kontrolní geny (viz kapitola 4.6.1 a 4.6.2) Poté byl připraven mix podle tabulky 22.

**Tabulka 22:** Příprava mixu pro PCR LOH analýzy.

Složka mixu:	Množství na 1 reakci (µl)
Fast Start Master Mix	7,5
Primer set (5µM každý)	0,5
DNA	0,5
H <sub>2</sub> O	6,5

Mix byl poté vložen do cycleru na program zobrazený v tabulce 23.

**Tabulka 23:** Cycler program pro LOH analýzu.

Program	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubace	1	95	09:30
Denaturace	35	95	00:30
Annealing		55	00:15
Extenze		72	00:30
Finální extenze	1	60	60:00
Hold	1	04	∞

Následně byla provedena fragmentační analýza, ve které bylo smícháno 0,5μl Liz, 24,5μl formamidu a 1μl DNA a poté vloženo do sekvenátoru ABI na příslušný program.

Cut-Off hodnota byla nastavena na 0,75/1,33.

#### 4.7.4 FISH

Výsledky z aCGH u nedagnostikovatelných RK byly potvrzovány metodou FISH. Sondy, které byly použity, byly v laboratoři praxí odzkoušené a bylo o nich známo, že dobře hybridizují. Všechny sondy (viz tabulka 24) byly od firmy Vysis/Abbott Molecular (Abbott Park, Illinois, USA).

**Tabulka 24:** Sondy použité pro konfirmační FISH na detekci aberací.

Číslo chromozomu	Typ sondy
1	Vysis LSI 1p36/ LSI 1q25 Dual-Color Probe
14	Vysis LSI IGH/CCND1 XT Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe
19	LSI 19q13/ 19p13 Dual-Color Probe
21	Vysis LSI 21
22	Vysis LSI 22 (BCR)

Řezy byly odparafinovány dvěma inkubacemi v xylenu po pěti minutách a dvěma inkubacemi v 96% etanolu po dvou minutách, poté byly vloženy do destilované vody na 5 minut. Následně byly řezy vloženy do roztoku 0,5ml „pretreatment

solution“+49,5ml H<sub>2</sub>O, předehřátého na 95°C ve vodní lázni (Memert, Schwabach, Německo) na 15 minut, poté nechány v roztoku 20 minut chladnout. Následně byly řezy vloženy na 5 minut do H<sub>2</sub>O a poté nechány trávit při 39°C/30min. v roztoku 100ul pepsinu a 40ml 0,01M HCl. Řezy byly poté vloženy na 5 minut do H<sub>2</sub>O při pokojové teplotě a odvodněny vzestupnou řadou etanolů (70%, 85%, 96%) vždy po dvou minutách. Poté se na řezy nakapala rozmíchaná sonda (0,5μl sondy+1,0μl H<sub>2</sub>O+3,5μl LSI bufferu), řezy byly zakryty krycím sklíčkem, které bylo utěsněno lepidlem chemoprenového typu a vloženo do přístroje StatSpin Thermobrite (Iris Internationale, Inc., Chatsworth, USA) na přednastavený program 85°C/8min., 37°C/16 hodin.

Druhý den byly řezy vyjmuty z přístroje Thermobrite, bylo sejmuto krycí sklo a řezy byly inkubovány při 74°C/2min. v roztoku 2xSSC pufru+0,3%NP4O. Poté byly řezy opláchnuty v 96% etanolu a nechány oschnout ve tmě. Nakonec bylo přidáno 3-6 μl DAPI (podle velikosti preparátu), přikryto novým krycím sklíčkem a okraje osušeny buničitou vatou.

Hotové preparáty byly prohlíženy pod 100x zvětšením s imerzním olejem ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japonsko). Pro hodnocení aneuploidií bylo započteno 100 odečitatelných jader.

Cut-off pro monosomii byl 45% jader s jedním signálem, pro trisomii 10% jader se třemi signály. (PETERSSON et al. 2010)

## **4.8 Analýza genu *FOXL2***

### **4.8.1 Izolace DNA a PCR kontrolní geny**

Po izolaci DNA a kontrole integrity DNA provedené podle výše uvedených postupů (viz kapitola 4.5.2, 4.6.1 a 4.6.2) byl amplifikován požadovaný fragment *FOXL2*.

### **4.8.2 Amplifikace**

Pro sekvenaci genu části sekvence v genu *FOXL2* (Gene Bank referenční sekvence NG\_012454.1) bylo zapotřebí nejdříve amplifikovat daný amplikon s využitím primerů se sekvencí 5'- AAAATAGCATCCGCCACAAC-3' a 5'GGAAGGGCCTCTTCATGC-3', což bylo provedeno PCR reakcí podle tabulky 25.



**Tabulka 25:** Příprava reakce pro amplifikaci fragmentu FOXL2 genu.

Reagencie	Množství na jednu reakci (μl)
HOT START Master Mix	12,5
Primer mix (10pmol/l)	1
DNA (100ng)	X
H <sub>2</sub> O	11,5 – x
Celkem	25

Vzniklá směs byla vložena do cycleru na program zobrazený v tabulce 26.

**Tabulka 26:** Program v cycleru pro amplifikaci fragmentu FOXL2 genu.

Program	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preaktivace	1	95	14:00
Denaturace	40	95	01:00
Annealing		60	01:00
Extenze		72	01:00
Finální extenze	1	72	07:00
Hold	1	04	∞

#### 4.8.3 Čištění PCR reakce

Amplifikovaný PCR produkt byl přečištěn magnetickými kuličkami Agencourt AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Beverly, MA, USA). Na přístroji se smíchá 20μl PCR produktu+36μl AMPure roztoku a promíchá. Magnetické kuličky s navázanou DNA se separují 5-10minut, po usazení kuliček je odsán supernanant. Přidá se 200μl 70% etanolu, inkubuje 30sek. při pokojové teplotě (room temperature – RT) a poté se etanol odsaje. Kuličky se suší 20 minut při RT a DNA se eluuje 40μl TE pufu.

#### 4.8.4 Sekvenační reakce

Do sekvenační reakce se dalo 6ul magnetickými kuličkami přečištěného produktu a přidal se do výsledné koncentrace 3,2μM (1,0μl) primer, 2,0μl BigDye a 1,0μl SEQ pufu a vložilo se do cycleru na zobrazený v tabulce 27.

**Tabulka 27:** Program v cycleru pro sekvenační reakci.

<b>Program</b>	<b>Počet cyklů</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (min.)</b>
Denaturace	25	96	00:10
Annealing		50	00:05
Extenze		60	04:00
Hold	1	04	∞

#### 4.8.5 Přečištění sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla přečištěna opět pomocí magnetických kuliček takto: 10μl PCR produktu+10μl CleanSEQ+42μl 85% etanolu, směs se promíchá. Kuličky s DNA se separují 5 minut a odstraní se tekutina nad kuličkami. Kuličky se poté promyjí 100μl 85% etanolu 30sec./RT, poté se odsaje etanol a tento krok se ještě jednou opakuje. Kuličky se nechají sušit 10 minut při RT a DNA z kuliček se eluuje 30μl TE pufrem s inkubací 5min/RT. Poté se ještě zředí TE pufrem na 70μl a magnetické kuličky se separují od TE pufrem.

#### 4.8.6 Kapilární elektroforéza

Poté byla provedena sekvenační analýza na automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) při konstantním napětí 13,2kV/20 min. Všechny reakce (včetně izolace DNA) byly provedeny v duplikátu.

Data byla vyhodnocena pomocí programu Bioedit (Ibis Biosciences, Carlsbad, Californie, USA).

## 5 Výsledky

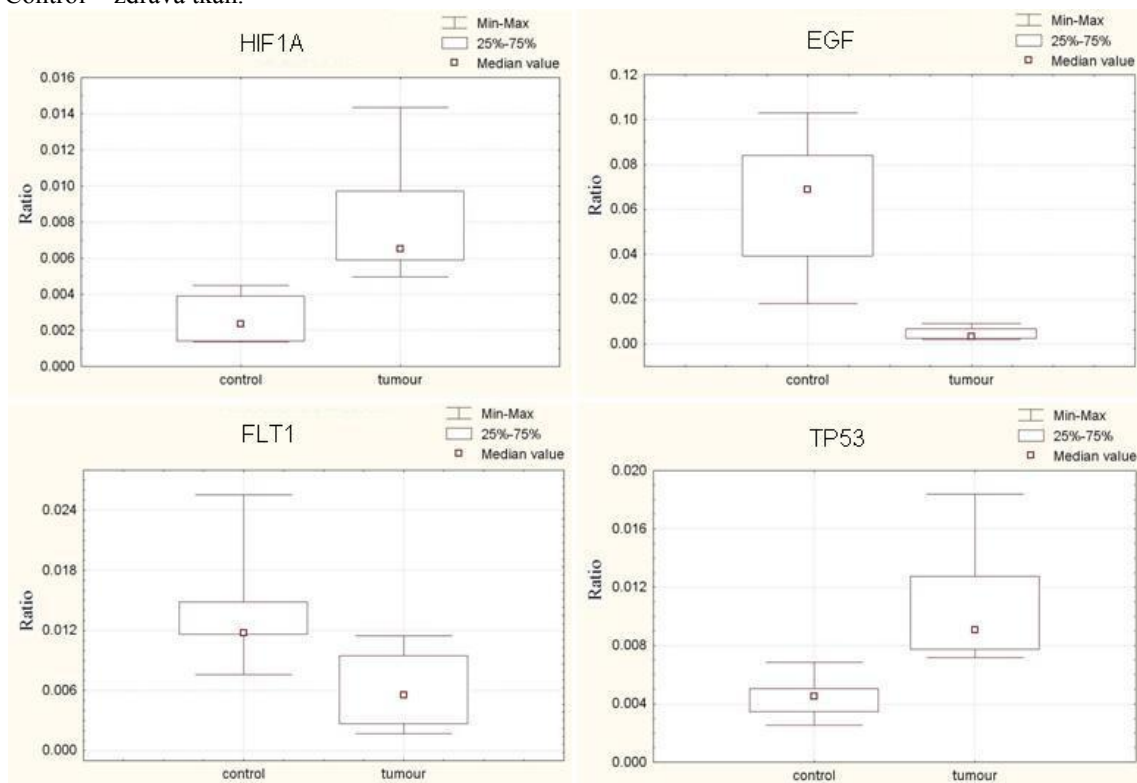
Některé ze získaných výsledků byly již publikovány v odborných časopisech. Jednalo se o publikace:

- 1) Hes O, Vaněček T, Petersson F, Grossmann P, Hora M, Perez Montiel DM, **Steiner P**, Dvořák M, Michal M. (2011): 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 Jul;19(4):347-51. PMID: 21293260.
- 2) Petersson, F., Vanecek, T., Michal, M., Martignoni, G., Brunelli, M., Halbhuber, Z., Spagnolo, D., Kuroda, N., Yang, X., Cabrero, I. A., Hora, M., Branžovský, J., Trivunic, S., Kacerovská, D., **Steiner, P.**, Hes, O (2011): A distinctive translocation carcinoma of the kidney, "rosette forming", t(6;11), HMB45 positive renal tumor: a histomorphologic, immunohistochemical, ultrastructural and molecular genetic study of 4 cases. *Human Pathol.* (v tisku).

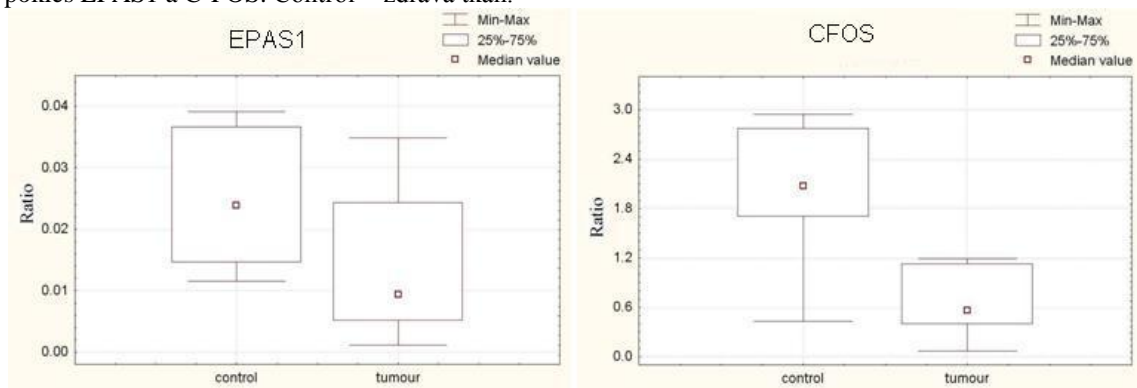
### 5.1 Exprese TRK

U tubulocystických renálních karcinomů byla provedena Real-Time PCR analýza, získaná data byla odeslána ke statistickému vyhodnocení. Statisticky významnými rozdíly hladin mRNA mezi skupinou TRK a skupinou zdravých tkání byly vzestup hladin mRNA HIF-1 $\alpha$  a TP53 a pokles hladin mRNA EGF a FLT1 (viz obrázek 20). Hraničně statisticky významnými rozdíly byly poklesy hladin mRNA HIF-2 $\alpha$  (EPAS1) a C-Fos (viz obrázek 21). U genů VHL, FGF2, VEGFA, KDR, EGFR, HRas (viz obrázek 22), C-Jun, MMP14, PTEN, Akt2, Akt3, mTOR (viz obrázek 23), NF- $\kappa$ B a CTNNB1 (viz obrázek 24) nebyly zaznamenány statisticky významné změny hladin mRNA. Z analýzy byly pro malý počet hodnotitelných údajů vyloučeny geny CDH1, MAKP1, NOS3 a PDGFA. Výsledky byly v grafech zobrazeny jako poměr "Ratio", který představuje poměr hladiny mRNA cílového genu a hladiny mRNA referenčního genu ACTB.

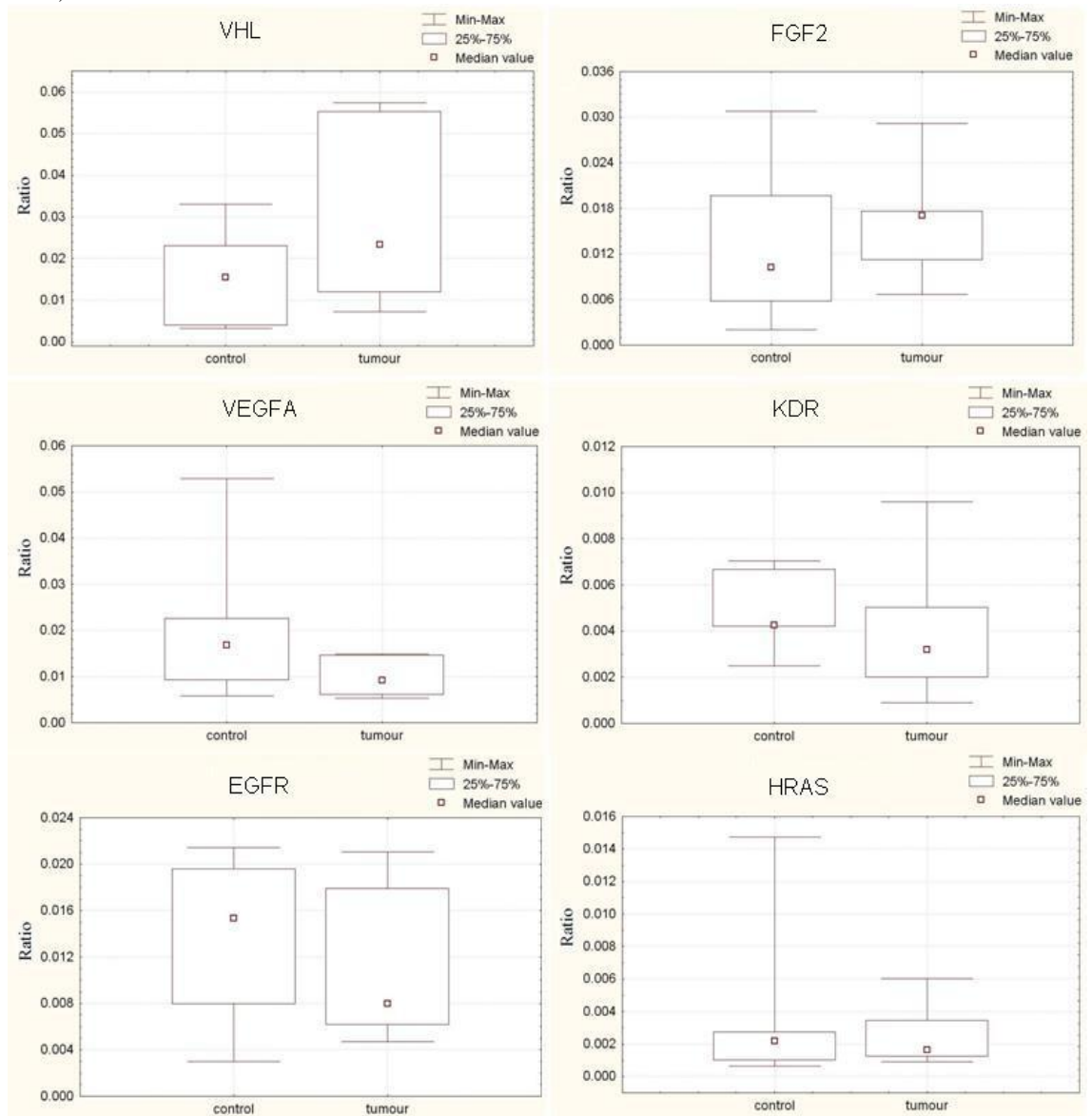
**Obrázek 20:** Grafické znázornění signifikantních změn hladin mRNA pomocí box plotů: Signifikantní vzestup hladiny mRNA genů HIF-1 $\alpha$  a TP53 a signifikantní pokles hladiny mRNA genů EGF a FLT1. Control = zdravá tkáň.



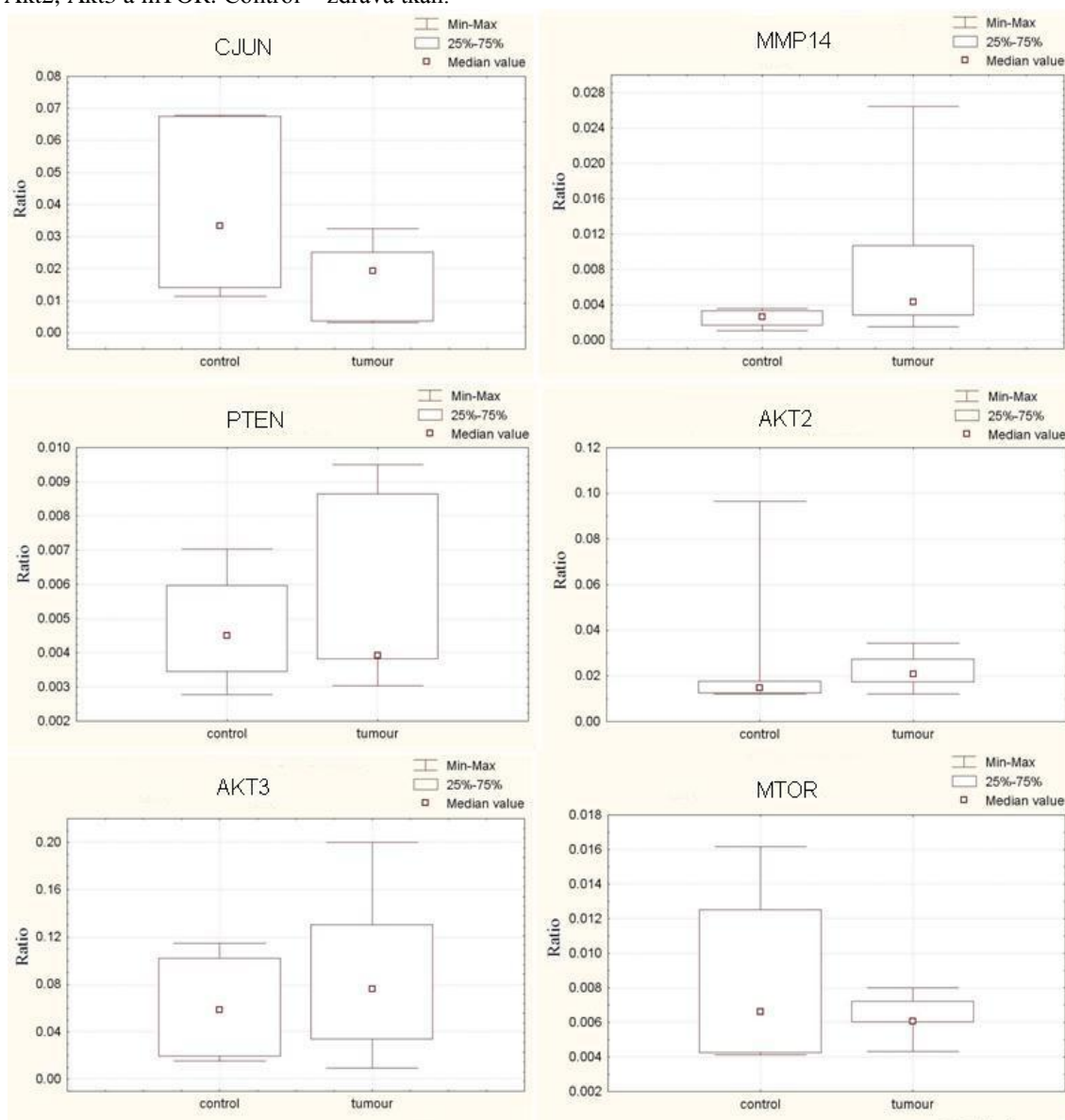
**Obrázek 21:** Grafické znázornění hraničně signifikantních změn hladin mRNA: Hraničně signifikantní pokles EPAS1 a C-FOS. Control = zdravá tkáň.



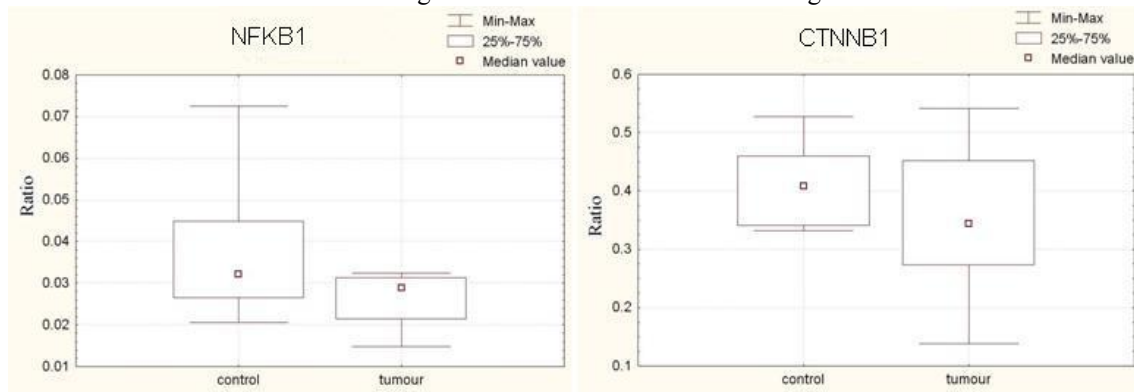
**Obrázek 22:** Grafické znázornění nesignifikantních změn hladin mRNA u genů VHL, FGF2, VEGFA, KDR, EGFR a HRAS. Control = zdravá tkáň.



**Obrázek 23:** Grafické znázornění nesignifikantních změn hladin mRNA u genů C-Jun, MMP14, PTEN, Akt2, Akt3 a mTOR. Control = zdravá tkáň.



**Obrázek 24:** Grafické znázornění nesignifikantních změn hladin mRNA u genů NF- $\kappa$ B a CTNNB1.



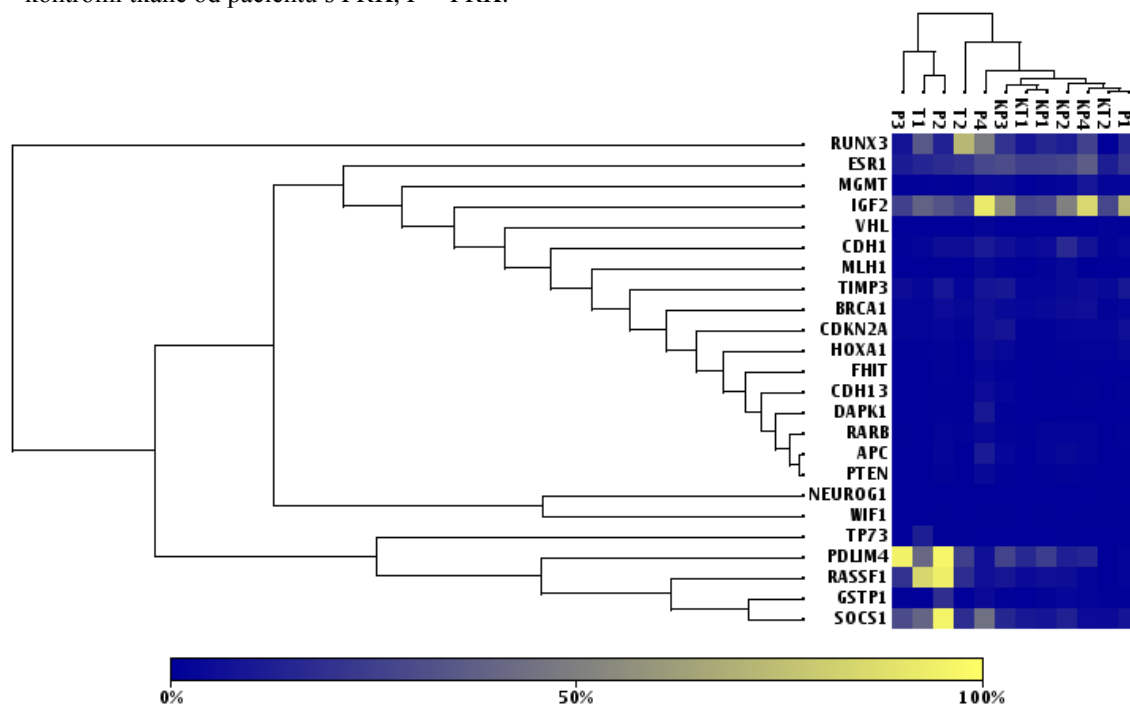
## 5.2 Metylace

Výsledky metylace tumor supresorových genů shrnuje obrázek klastrové analýzy 24. Nejvyšší rozdíly v metylacích u TRK byly zaznamenány u genů *PDLIM* (40,52% metylováno v nádorové tkáni proti 15,43% ve zdravé tkáni a 24,65% proti 0,12%), *RASSF1* (84,54% proti 3,71% a 17,44% proti 0,14%), *RUNX3* (33,80% proti 8,34% a 72,47% proti 0,25%) a *SOCS1* (38,09% proti 9,18% a 17,56% proti 3,77%). U ostatních genů nebyly nalezeny výrazné rozdíly. S ohledem na procenta metylace lze říci, že u vzorku T1 byl výrazně hypermetylován (z 84,54%) pouze promotor genu *RASSF1A*, u T2 (72,47%) pouze *RUNX3*.

Z hlediska papilárních karcinomů je zřejmé, že ne každý ze čtyř studovaných tumorů vykazoval stejný metylační profil. Nejkonzistentněji u PRK vycházela hypermetylace *IGF2*. S U dvou PRK byla nalezena hypermetylace promotoru *PDLIM*, hypermetylace promotorů *RASSF1A* byla nalezena u jednoho PRK a hypermetylace promotoru *SOCS1* také u jednoho PRK.

Porovnání PRK a TRK nejlépe shrnuje obrázek 25, na kterém je zobrazena „Average linkage Heatmap“, ze kterého je zřejmé, že PRK a TRK jsou si z hlediska metylačních profilů velmi podobné, jelikož jsou ve společném klastru odlišitelném od zdravých tkání.

**Obrázek 25:** Klastrová analýza „Average Linkage“. KT = zdravé tkáně od pacientů s TRK, T = TRK, KP = kontrolní tkáně od pacientů s PRK, P = PRK.



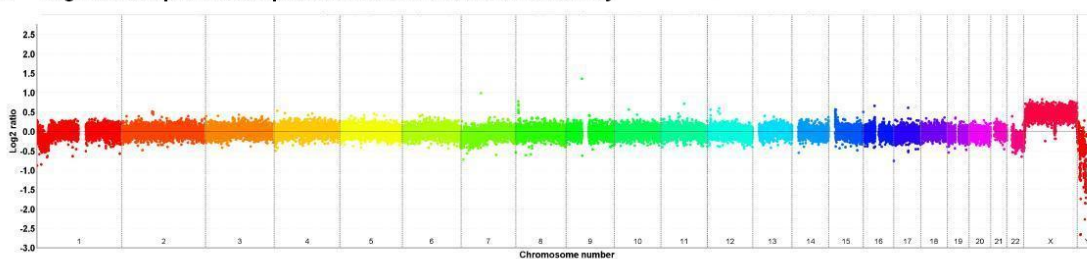
## 5.3 Detekce chromozomálních aberací pomocí aCGH

### 5.3.1 Příklad A

Pomocí aCGH analýzy provedené ve spolupráci se společností Central European Biosystems (Praha, Česká Republika) se podařilo detekovat u pseudorozetového tumoru ztrátu 1p35.1-1p36.21 a ztrátu dlouhého raménka chromozomu 22 (viz obrázek 26). Tyto ztráty byly potvrzeny LOH analýzou (obrázek 27).

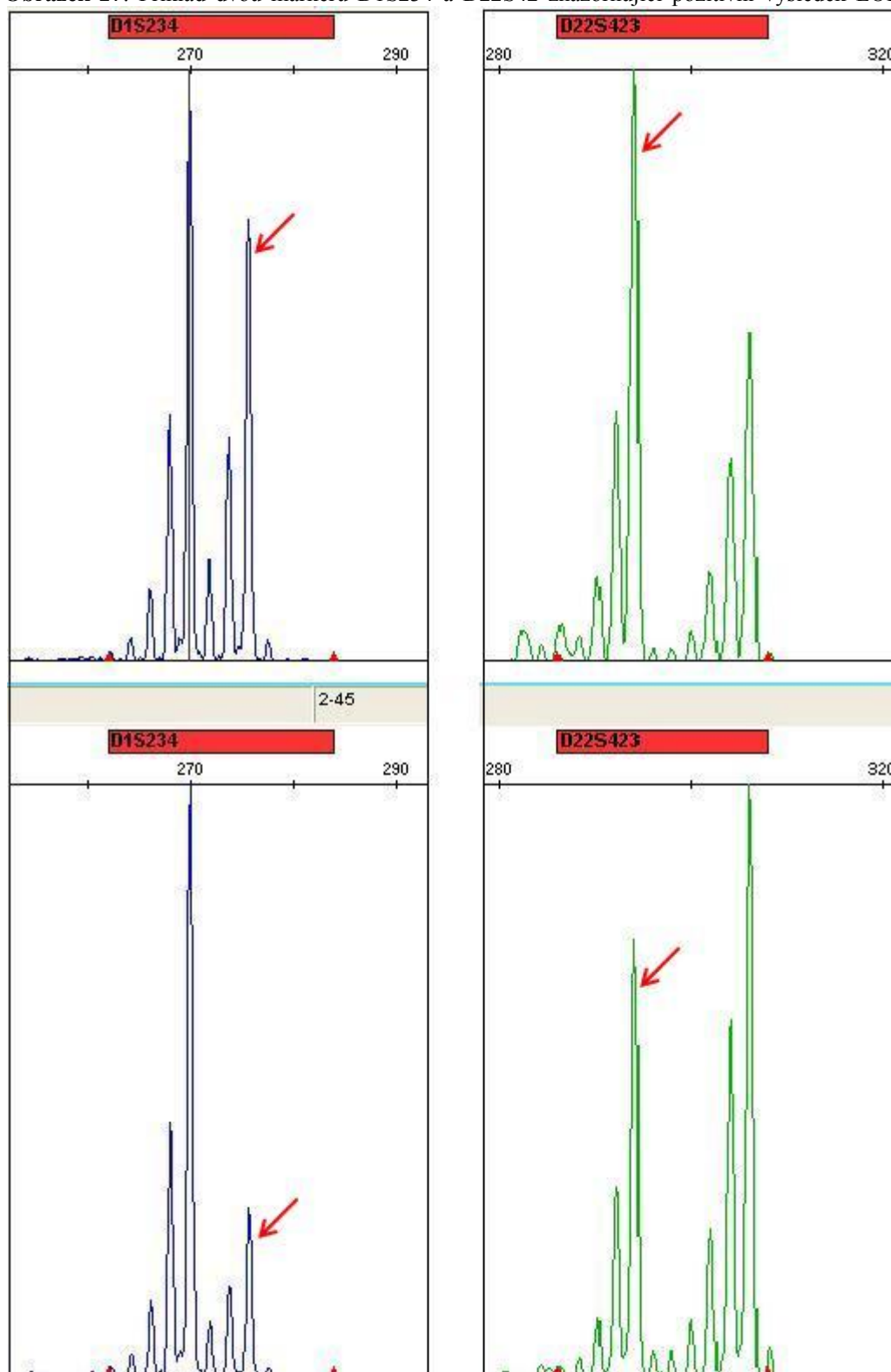
**Obrázek 26:** Schéma chromozomálních změn aCGH pro pseudorozetový karcinom.  
Cut-Off: -0,193/0,170.

**A** Segmentační profil aCGH pseudorozetového karcinomu ledviny





**Obrázek 27:** Příklad dvou markerů D1S234 a D22S42 znázorňující pozitivní výsledek LOH analýzy.



Vedle aCGH a LOH byly u tohoto vzorku provedeny histologické, imunohistochemické a molekulárně genetické analýzy, konkrétně detekce mutací a metylací VHL genu a translokací  $t(6;11)(\text{Alpha}/\text{TFEB})$  a  $t(X;17)(\text{ASPL}/\text{TFE3})$ , na

kterých jsem se nepodílel. Tento případ byl pak spolu s několika dalšími zaslán a přijat k publikaci. (PETERSSON et al. 2011, v tisku. Viz příloha 1)

### 5.3.2 Případ B a C

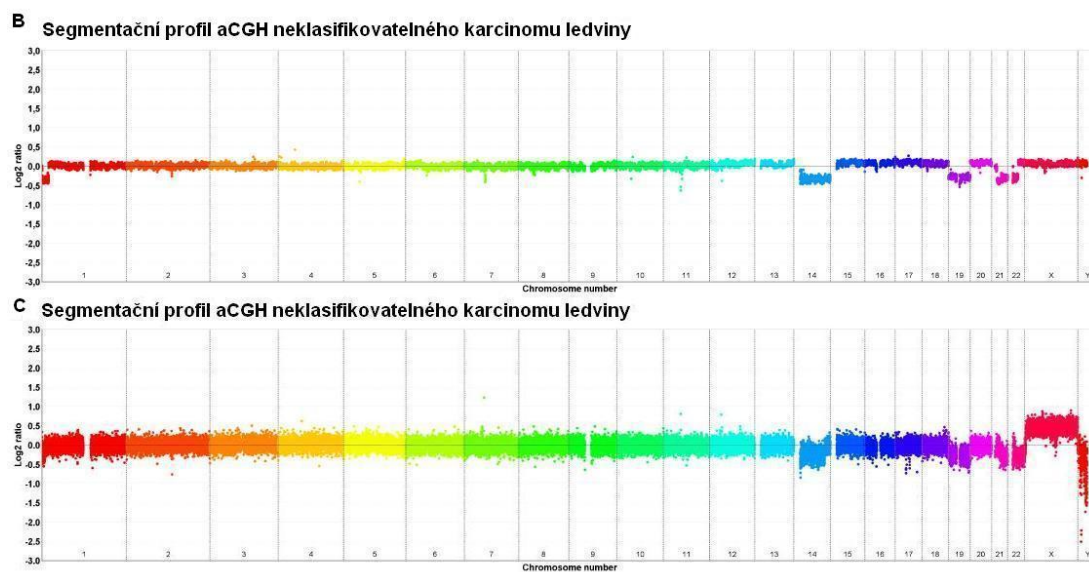
Pomocí aCGH analýzy provedené ve spolupráci se společností Central European Biosystems (Praha, Česká Republika) se podařilo detekovat u neidentifikovatelných karcinomů četné ztráty (viz obrázek 28).

U případu B byly detekovány ztráty 1p36.23-pter, 14q11.1-q32.11, ztráta celého chromozomu 19 a ztráty 21q21.2-pter a 22q.

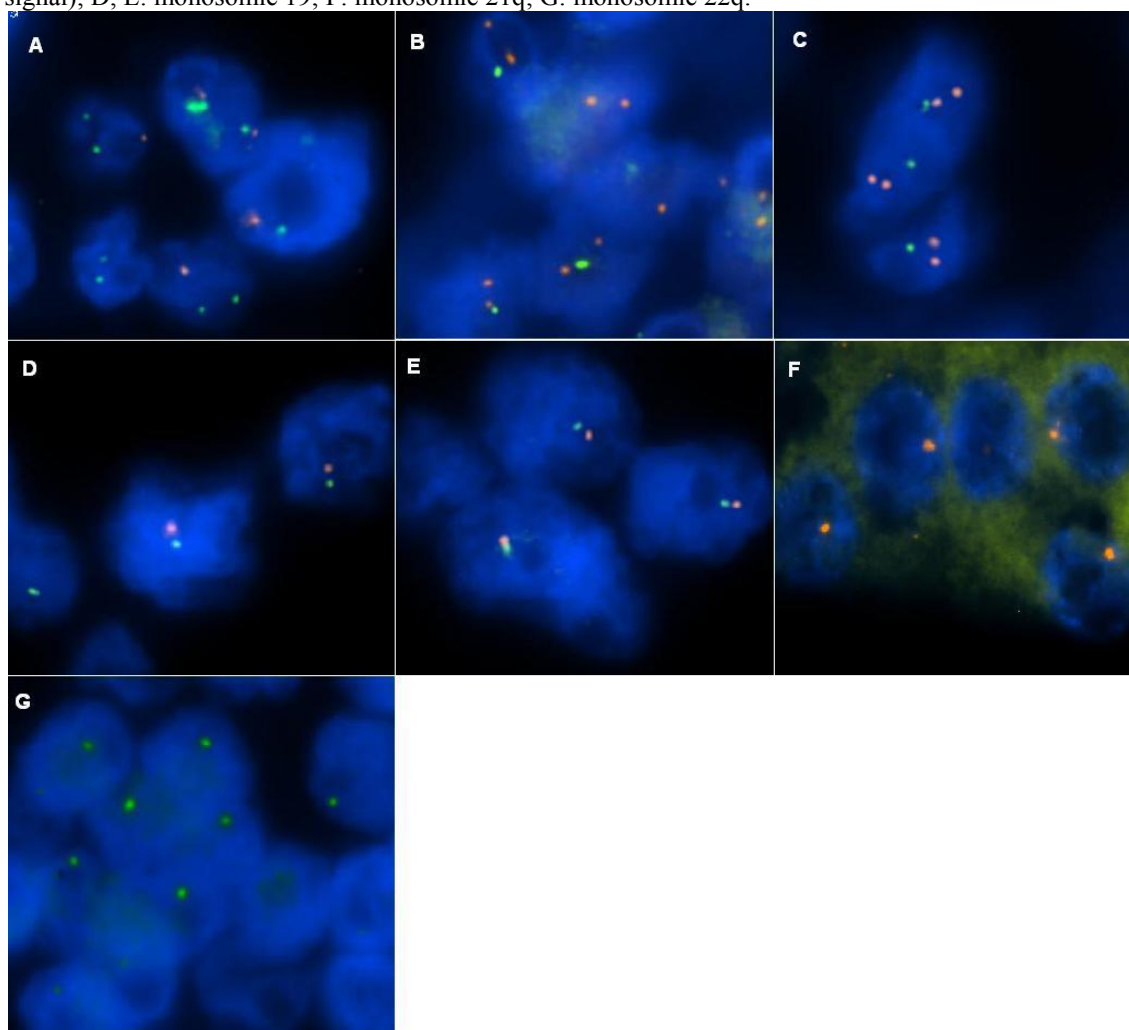
U případu C byly detekovány ztráty 1p36.13-pter, 14q, ztráta celého chromozomu 19, a ztráty 21q21.1-qter a 22q11.1-q12.2.

Tyto ztráty byly potvrzeny FISH analýzou (viz obrázek 29).

**Obrázek 28:** Schéma chromozomálních změn detekovaných aCGH pro neidentifikovatelné renální karcinomy.



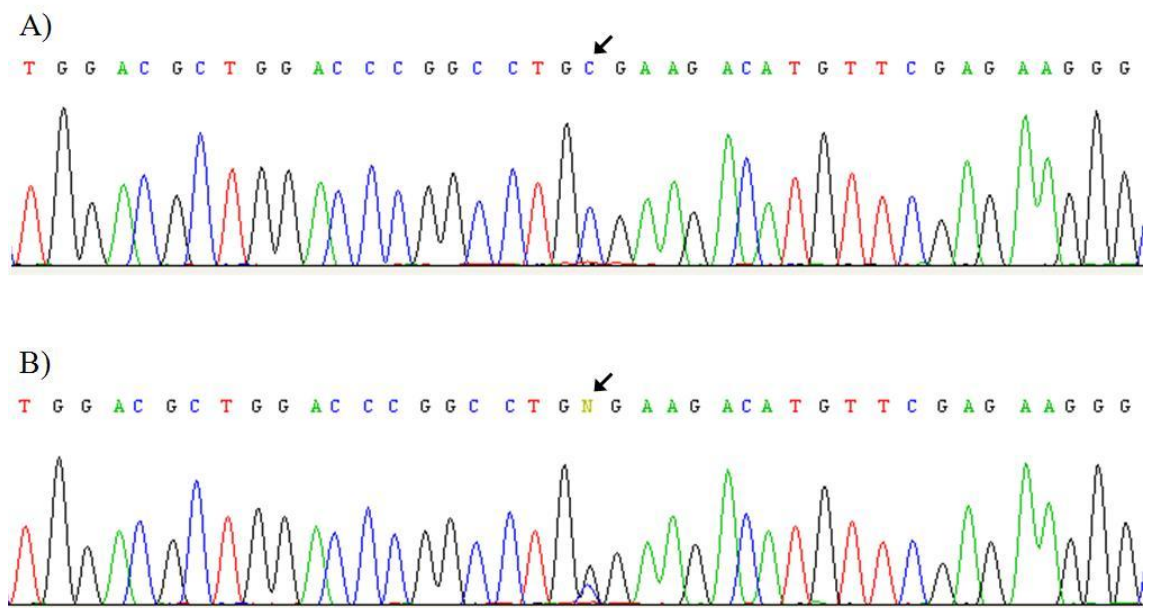
**Obrázek 29:** Ukázka analýzy FISH prokazující: A, B: monosomie 1p36; C: monosomie 14 (zelený signál); D, E: monosomie 19; F: monosomie 21q; G: monosomie 22q.



#### 5.4 Detekce *FOXL2* mutace c.402C>G

Přímou sekvenční analýzou genu *FOXL2* nebyla prokázána mutace c.402C>G u 3 případů testikulárních nádorů ATGCT a 4 případů ISCST. U třech kontrolních ovariálních ATGCT (jeden nebylo možné analyzovat) byla tato mutace nalezena. (viz obrázek 30). U těchto vzorků byly vedle molekulárně genetické analýzy genu *FOXL2* provedeny také histologické a imunohistochemické vyšetření na kterých jsem se nepodílel. Tento soubor byl poté publikován. (Hes et al. 2011. Viz. příloha 2)

**Obrázek 30:** detekce mutace c.402C>G genu *FOXL2*.



## 6 Diskuze

### 6.1 Exprese TRK

Byly porovnány hladiny mRNA 20 genů v signálních drahách spojovaných s angiogenezí (PI3K/Akt/mTOR a RTK/MAPK) u 8 vzorků TRK a 6 vzorků přilehlé zdravé tkáně. Ze získaných výsledků bylo cílem odvodit tendenci k tvorbě cév u TRK a tak vhodnost použití antiangiogenních terapeutik zacílených na konkrétní těchto signálních drah (viz tabulka 1).

#### 6.1.1 PI3K/Akt/mTOR dráha

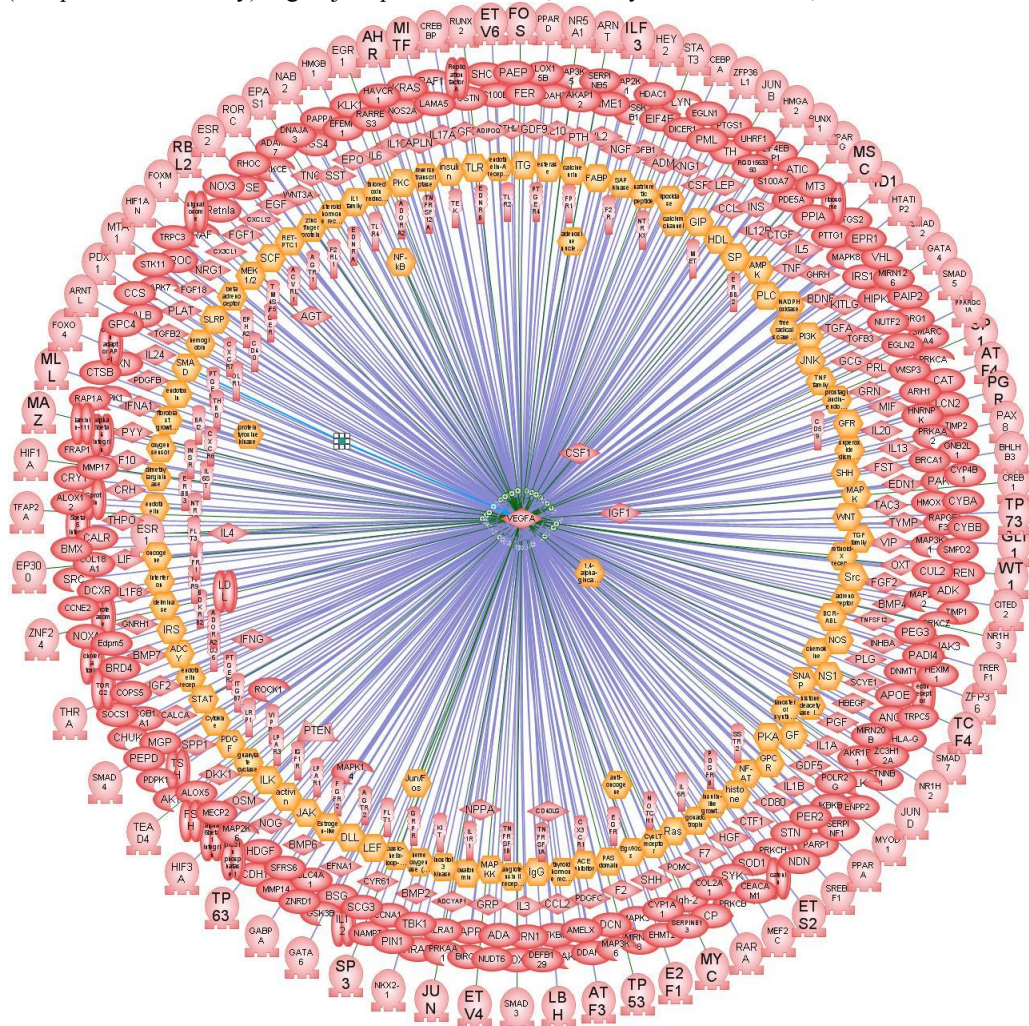
Z obrázku 23 ve výsledkové části je zřejmé, že nedochází k výrazným změnám exprese v PI3K/Akt/mTOR signální dráze na úrovni mRNA žádného z vybraných genů (PTEN, Akt2, Akt3 a mTOR), z čehož se dá usoudit, že TRK nebude mít tendenci k výrazné proliferaci a malignitě vlivem, která je spojována s touto aktivovanou dráhou (VALLADARES et al. 2006, CICENAS 2008, LI et al. 2008a, ADVANI 2010, MURE et al. 2010, WANG et al. 2011). Na základě těchto zjištění se tedy může spekulovat, že použití mTOR inhibitorů, jakými jsou temsirolimus a everolimus, nebude mít výrazný pozitivní dopad na léčbu pacientů. K této úvaze přispívá i fakt, že je nezměněná nebo spíše dokonce nesignifikantně zvýšená exprese VHL byla asociována s neúčinností mTOR inhibitorů u renálních karcinomů (THOMAS et al. 2006a).

#### 6.1.2 RTK/MAPK dráha

U dráhy, u které dochází k interakci mezi VHL a HIF-1 $\alpha$  byla pozorována zvýšená hladina mRNA u HIF-1 $\alpha$ . To nasvědčuje tomu, že tumory jsou v hypoxickém stresu a měly by mít tendenci k tvorbě nového cévního zásobení prostřednictvím downstream genů, jako např. VEGFA apod (ROY et al. 2003, WANG et al. 2004, KAGEYAMA et al. 2006, ALAM et al. 2009). V tomto experimentu byl však u TRK pozorován hraničně signifikantní pokles hladiny mRNA VEGFA genu. Tento nesoulad lze vysvětlit tím, že VEGFA je regulován i jinými geny než pouze transkripčním faktorem HIF-1 $\alpha$  (GARRIDO et al. 1993, METEOGLU et al. 2008, PEI et al. 2010). Počítačový program Ariadne identifikoval přes 400 genů, které přímo nebo nepřímo regulují expresi VEGFA (viz obrázek 31). Některé z těchto genů byly v této studii také

zkoumány. Jednalo se o *NF-κB*, dále o *C-Fos* a *C-Jun*, jenž dohromady tvoří transkripční faktor zvaný AP-1, jež je vedle HIF1a dalším z hlavních regulátorů exprese mRNA VEGFA (GARRIDO et al. 1993, Oh et al. 2010). Analýza exprese *C-Fos* a *C-Jun* vykázala mírně snížené hladiny mRNA, což je v souladu s mírně sníženou expresí VEGFA mRNA. V tomto případě tedy ani zvýšená transkripce HIF1a zřejmě nedokáže překonat negativní vliv snížené exprese komponent AP1 transkripčního faktoru a velmi pravděpodobně i dalších regulačních mechanismů.

**Obrázek 31:** Schéma funkčních tříd (žlutě) a genů (ostatní barvy), které přímo (vnější okruh) nebo nepřímo (oba prostřední okruhy) regulují expresi VEGFA. (Pathway Studio Ariadne)



Z dalších proteinů spadajících do skupiny růstových faktorů podporujících angiogenezi byly studována exprese genů pro růstové faktory EGF a bFGF a EGFR.

U TRK byla signifikantně snížená hladina EGF mRNA, zatímco hladina EGFR mRNA nebyla významně změněna. Vzhledem k tomu, že EGF aktivuje MAPK dráhu

(JOHNSON et al. 1996), aktivace MAPK dráhy prostřednictvím EGF a EGFR tedy není příliš pravděpodobná. Nelze tedy doporučit použití EGFR inhibitorů používaných např. u kolorektálních karcinomů (D'ANDREA a GASPARINI 2007, LEE a CHU 2007). Přestože u RK byly nalezeny zvýšené hladiny EGFR mRNA, není aktivace MAPK dráhy prostřednictvím EGFR hlavní dráhou ve vývoji RK (RAVAUD et al. 2007). Výjimkou pro aktivaci MAPK dráhy může být, že by došlo k její aktivaci mutací *EGFRm* jako je tomu např. v nemalobuněčných plicních nádorech (CHOU et al. 2010). U renálních karcinomů je však obdobný mechanismus dosud vzácností (IYEVLEVA et al. 2009).

Z dalších receptorů pro růstové faktory byly v této studii analyzovány hladiny mRNA FLT1 a KDR, což jsou nejdůležitější receptory pro růstový faktor VEGFA (de VRIES et al. 1992, QUINN et al. 1993). Hladina mRNA u FLT1 byla v tomto experimentu statisticky významně snížena, hladina KDR mRNA zůstala nezměněna.

Dále byla v této detekována nezměněná hladina mRNA HRAS.

Výše zmíněné výsledky naznačují, že RTK/MAPK dráha, která je přímo angiogenní, není výrazně aktivní. Hladiny mRNA některých jejích genů jsou naopak snižené. Nelze očekávat výrazný efekt antiangiogenních terapeutik (sunitinibu, sorafenibu, pazopanibu, axitinibu, cediranibu, tivozanibu) zacílených na proteiny této dráhy u TRK, stejně jako inhibitorů EGFR. Toto tvrzení je v částečné shodě s daty publikovanými Hora et al. (2010), kde byli dva pacienti s metastatickými TRK léčeni mimo jiné sunitinibem, přičemž jeden z nich na léčbu částečně zareagoval a druhý nikoliv.

### 6.1.3 p53

Dalším zjištěním je signifikantní zvýšení hladiny mRNA nejznámějšího tumor-supresorového proteinu p53. Tyto naše výsledky jsou ve shodě s již dříve publikovanými výsledky (OSUNKOYA et al. 2009). Zvýšené hladiny mRNA p53 byly nalezeny v řadě nádorů. Většinou je toto zvýšení hladin mRNA p53 zároveň spojeno s mutací p53, vzniklý protein je tedy nefunkční.(MULLER et al. 2011) Například vysoká exprese a zároveň mutace p53 byla nalezena v korelaci s velmi agresivním chováním u lymfomů z plášťových buněk (HERNANDEZ et al. 1996). Vysoká hladina nemutovaného p53 by u nádorů s největší pravděpodobností znamenala vyvolání apoptózy buněk (OLLMANN et al. 2000, MILLER et al. 2011). Z tohoto důvodu je

vysoce pravděpodobné, že i ve vzorcích TRK analyzovaných v této studii je *TP53* mutovaný, což by bylo vhodné potvrdit v navazující práci.

HIF-1 $\alpha$  na sebe váže a tím inhibuje MDM2, který tak nemůže degradovat p53 prostřednictvím ubiquitinace (CHEN et al. 2003). Z toho vyplývá, že zvýšení HIF-1 $\alpha$  by mohlo vést ke stabilizaci p53. Větší stabilita nemutovaného p53 by opět zvyšovala jeho potenciál k vyvolání apoptózy, protože TRK vzorků této studie nebyla apoptóza pozorována. Tento fakt spolu se skutečností, že hladina mRNA byla zvýšená u TRK nasvědčuje tomu, že TP53 bude pravděpodobně mutován.

Byl též ukázán vztah mezi p53 a VEGF a sice, že p53 vytvoří komplex s molekulou SP-1 a ten následně inhibuje transkripci VEGF (PAL et al. 2001). Vztah mezi signifikantně vyšší hodnotou mRNA u p53 a hraničně sníženou expresí VEGF byl touto studií prokázán. Otázkou je, nakolik je tento výsledek náhodný či způsobený majoritně právě tímto vztahem.

#### **6.1.4 NF- $\kappa$ B a CTNNB1**

V této studii byla detekována nezměněná hladina mRNA NF- $\kappa$ B a CTNNB1. Hladina mRNA CTNNB1 byla již studována v souvislosti s hepatocelulárním karcinomem (LAI et al. 2011). Nezměněné hladiny mRNA obou těchto genů bohužel moc nevypovídají o jejich aktivitě. Pokud by byly hladiny mRNA NF- $\kappa$ B a CTNNB1 signifikantně zvýšené, byl by to impuls pro další studium těchto genů. Za prvé provést analýzu jejich skutečné aktivity na úrovni proteinů pomocí imunohistochemie. Za druhé, vzhledem k faktu, že NF- $\kappa$ B i CTNNB1 jsou transkripční faktory, změřit hladiny mRNA jejich cílových genů (pro NF- $\kappa$ B: I $\kappa$ B, Bclx a Flip; pro CTNNB1 např. *Brn-2*, *MiTF-M* a *Dct*)

#### **6.1.5 MT1-MMP a HIF-2 $\alpha$**

Dalším genem studovaným v této práci byla hladina MT1-MMP. Vysoká hladina matrix metaloproteáz vede k vysoké invazivitě nádoru a k tvorbě metastáz (LIOTTA a STETLER-STEVENSON 1990, FISHER et al. 2009). Mnou studovaný materiál vykazoval téměř stejnou expresi v nádorové i nenádorové tkáni a tudíž se lze domnívat, že TRK nebudou mít výrazný sklon k agresivnímu chování. V souladu s tímto zjištěním je jen hraničně signifikantně snížená exprese HIF-2 $\alpha$ , který je transkripčním faktorem MT1-MMP (PETRELLA a BRINKERHOFF 2009).



## 6.2 Metylace

Metylace v promotorech genů má výrazný vliv na expresi daného genu. Nádorové tkáně často hypermetylují geny, které brání jejich růstu (tumor supresory) a naopak dochází k hypometylaci promotorů u genů, které jsou nádoru prospěšné (onkogeny).

V této studii byly mezi sebou porovnány dva typy nádorů (TRK a PRK) z hlediska jejich metylačních profilů 24 tumor supresorových genů (viz tabulka 17). Důvodem této studie bylo zjistit míru příbuznosti mezi těmito dvěma typy nádorů, která byla diskutována v literatuře (YANG et al. 2008, ZHOU et al. 2009, HORA et al. 2010). Pokud je mi známo, tak toto je první studie porovnávající metylační profily mezi TRK a PRK a zároveň první studie zabývající se metylacemi TRK vůbec.

U 19 z 24 genů nebyla jak u TRK tak u PRK detekována žádná metylace (či velmi nízká). U obou typů nádorů byla nalezena metylace v genech *RASSF1a*, *PDLIM* a *SOCS1*. Pouze gen *IGF2* byl specificky metylován pouze ve vzorcích PRK a gen *RUNX3* byl specificky metylován pouze ve vzorcích TRK.

### 6.2.1 RASSF1A

*RASSF1A* (Ras association domain family member 1A) je jedna z izoform tumor supresorového genu *RASSF1*, který je lokalizován na lokusu 3p21.3. Celkem se vyskytuje 6 izoform *RASSF1A* a většina z nich obsahuje Ras asociovanou doménu a SARAH protein-protein motiv na C-konci (DONNINGER et al. 2007). Obsahuje doménu asociovanou a Ras onkogenem (DAMMANN et al. 2000), ale postrádá jakoukoliv enzymatickou aktivitu. Pravděpodobně funguje jako kostra pro skládání multimerních tumor supresorových komplexů. *RASSF1A* moduluje mnohé signální dráhy týkající se apoptózy (VOS et al. 2000), kontrolního bodu buněčného cyklu (SHIVAKUMAR et al. 2002, SONG et al. 2004), genomické stability (van der WEYDEN et al. 2005) a dalších. Mutace se objevují u různých typů nádorů v menší míře (15%), než hypermetylace jeho promotoru (asi 70%) (CHEN et al. 2005, PAN et al. 2005). Obnovení exprese *RASSF1A* v buněčných liniích je asociována s nižší tumorigenitou (BURBEE et al. 2001). Přijmutím, že *RASSF1A* je tumor supresor, mohou být studie knock-outů tohoto genu u myši. Knock-out byl asociován s vyšší tumorigenitou myši (TOMMASI et al. 2005, van der WEYDEN et al. 2005).

Na SRK buněčných liniích léčených 5 – azacytidinem došlo k demetylacii a obnovení exprese RASSF1A (MORRISSEY et al. 2001, REU et al. 2006). Pro cílení terapie proti metylacím by se tedy 5 – azacytidin mohl ukázat jako vhodný kandidát.

Hypermetylace *RASSF1A* byla pozorována v běžných typech RK a to s průměrnou četností 79% u PRK, 44% u SRK (MORRISSEY et al. 2001, GONZALGO et al. 2004, DULAIMI et al. 2004 a COSTA et al. 2007, ELLINGER et al. 2011), 31% u CHRK (DULAIMI et al. 2004 a COSTA et al. 2007), 40% u onkocytomu (GONZALGO et al. 2004, DULAIMI et al. 2004 a COSTA et al. 2007) a 60% u nádoru ze sběrných kanálků (DULAIMI et al. 2004). Shrnutí lze nalézt v tabulce 28. Mimo to, byla pozorována hypermetylace v 94,4% přilehlých normálních tkáních k PRK (ELLINGER et al. 2011). V tomto experimentu případě byla pozorována hypermetylace *RASSF1A* pouze u jednoho PRK ze čtyř (25%), ale také u jednoho TRK ze dvou (50%). Vzhledem k časté metylaci *RASSF1A* v renálních karcinomech, ale i v řadě jiných zcela nepříbuzných nádorů (CALIPEL et al. 2011, MALPELI et al. 2011, TOMASSI et al. 2011) nelze z této metylace usuzovat na příbuznost mezi TRK a PRK.

**Tabulka 28:** Shrnutí četností metylace promotoru *RASSF1A* v různých typech renálních karcinomů (ELLINGER et al. 2011).

Study	Method	Papillary RCC	Clear cell RCC	Chromophobe RCC	Oncocytoma	Collecting duct
Morrissey et al. [5]	MSP	44% (12/27)	23% (32/138)	n.d.	n.d.	n.d.
Gonzalogo et al. [6]	MSP	100% (9/9)	90% (19/21)	n.d.	0% (0/8)	n.d.
Dulaimi et al. [7]	qMSP	70% (14/20)	46% (23/50)	17% (1/6)	14% (1/7)	60% (3/5)
Costa et al. [8]	qMSP	100% (13/13)	81% (42/52)	40% (4/10)	90% (9/10)	n.d.
Ellinger	qMSP	100% (32/32)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Total</i>		79% (80/101)	44% (116/261)	31% (5/16)	40% (10/25)	60% (3/5)

*MSP, methylation specific PCR; qMSP, quantitative methylation specific PCR; RCC, renal cell carcinoma; n.d., not done.*

## 6.2.2 RUNX3

*RUNX3* je lokalizován na lokusu 1p36.13 – p36.11. Kóduje DNA vazebnou podjednotku heterodimerního transkripčního faktoru PEBP2/CBF (VOGIATZI et al. 2006), která je regulována signální dráhou TGF-β/Smad (BAE a CHOI 2004).

*RUNX3* je nejstarším členem rodiny transkripčních faktorů *RUNX1*, *RUNX2* a *RUNX3*. Je regulován dvěma promotory na 3' a na 5' konci. Je exprimován např. v mezenchymu, krevních buňkách a neuronech. Je považován za tumor supresor (VOGIATZI et al. 2006). Na buněčných liniích bylo prokázáno, že aktivní *RUNX3* inhibuje antiapoptotický gen *Bcl2* (LI et al. 2008b). *RUNX3* je degradován ubiquitinací

proteinem MDM-2 (CHI et al. 2009). Dále bylo zjištěno, že aktivace RUNX3 inhibuje angiogenezi (WU et al. 2009), takže jeho vyřazení může být nádoru prospěšné i v tomto směru.

Bylo prokázáno, že je inaktivován epigeneticky nebo aberantní lokalizací proteinu ve vysokém procentu především gastrických tumorů (VOGIATZI et al. 2006). Naopak u nádorů hlavy a krku je jeho exprese spojována s maligním chováním (TSUNEMATSU et al. 2009).

Přestože byl *RUNX3* výrazně hypermetylován jen v jednom vzorku TRK, částečná metylace se objevila i ve druhém (viz obrázek 24). Vzhledem k tomu, že na rozdíl od TRK byla pozorována tato hypermetylace jen v jednom vzorku PRK a k tomu velmi slabá, mohla by metylace *RUNX3* sloužit jako marker pro rozlišení TRK od PRK. Další studie zahrnující více pacientů budou potřeba pro přijetí nebo vyvrácení této hypotézy. Zároveň, pokud je mi známo, je toto první informace o metylaci *RUNX3* v renálních karcinomech.

### 6.2.3 IGF2

Gen *IGF2* se spolu s genem *H19* nachází na lokusu 11p15.5. Tyto dva geny jsou regulovány zajímavým mechanismem. Mají společnou regulační oblast IC1 (downstream od *IGF2* a upstream od *H19*), jež je regulována pomocí metylace. Pokud je IC1 demetylován, umožňuje to nasednutí CTCF faktoru, což následně znemožní nasednutí enhancerů na promotor *IGF2*. Je tedy exprimován pouze H19. Pokud je IC1 metylován, znemožní to nasednutí CTCF faktoru na tento element a je tedy umožněna exprese *IGF2* a exprese H19 je znemožněna. Ve zdravých tkáních je *IGF2* exprimován pouze z paternální alely (maternální imprinting). Pokud je tedy IC1 imprintován na otcovské i mateřské alele, vede to k expresi *IGF2* a represí H19. Fenotypicky se tato alterace projevuje jako Beckwith-Weidermanův syndrom charakterizovaný nadměrným a často i aberantním růstem pacientů, naopak demetylace vede k růstové retardaci zvané Russel-Silver syndrom (CHOUFANI et al. 2010).

V tomto experimentu byla pozorována hypermetylace promotoru *IGF2* v PRK a v některých zdravých tkáních u PRK, což by s dostupnými informacemi znamenalo jeho zvýšenou expresi. Bylo zaznamenáno, že *IGF2* může, mimo jiné, pozitivně regulovat expresi HIF-1 $\alpha$  a VEGFA (KWON et al. 2004). Hypermetylace *IGF2* by tedy mohla být

jednou z alternativních cest vedoucích ke zvýšení exprese VEGF v PRK a mohla by být vhodným markerem pro selekci pacientů pro léčbu inhibitory VEGF.

Vzhledem k tomu, že byla u některých kontrolních tkání také detekována slabá metylace některých genů, je možné se s těmito výsledky přiklonit k tvrzení, že hypermetylace, i když v mírnější formě, se může vyskytovat již ve zdravé tkáni, která je v prekancerózním stádiu (ARAI et al. 2011).

Vzhledem k faktu, že hypermetylace IGF2 byla v této studii pozorována jen u PRK a ne u TRK, je možné, že na základě této metylace bude možné rozlišit tyto dva typy nádorů.

Závěrem lze tedy říci, že porovnáním metylačního profilu 24 tumor supresorových genů u dvou vzorků TRK a 4 vzorků PRK a následným zpracováním dat pomocí klastrové analýzy, že PRK a TRK jsou si vzájemně podobné vzhledem k tomu, že se objevují ve společném klastru, který je odlišitelný od normálních tkání. Přesto jsou však mezi jednotlivými typy tumorů a i mezi jednotlivými vzorky stejného typu patrné rozdíly.

Podobnost TRK s PRK byla již studována expresní analýzou s rozporuplnými výsledky. YANG et al. (2008) využil na expresní microarray jeden vzorek TRK, který byl zamražený v tekutém dusíku. Výsledkem při porovnání expresního profilu s PRK byla vysoká podobnost s těmito nádory. Naproti tomu AMIN et al. (2009) expresní analýzou 4 TRK, které byly fixované v parafínu, a porovnáním jejich profilů s markery zjištěnými předchozími studii nenašel výraznou podobnost mezi těmito typy nádorů. Rozpor mezi těmito výsledky může být způsobem porovnáním jen některých genů sloužících jako markery v případě AMIN et al. (2009) nebo v případě YANG et al. (2008) použitím pouze jednoho případu, který se mohl mít vyjíměčnou expresi. Oba autoři mohli dojít k odlišným výsledkům i z důvodu použití různého výchozího materiálu, např. přílišnou fragmentací RNA u formalinové fixace. Při použití aCGH byly nalezeny u TRK a PRK stejné chromozomální aberace, konkrétně se jedná o trisomii chromozomu 7, trisomii chromozomu 17 a ztráty Y chromozomu. Z tohoto hlediska jsou si tedy TRK a PRK velmi blízké. Odlišné jsou si tyto dva typy nádory pouze v četnosti výskytu těchto aberací. (KOVACS et al. 1991, YANG et al. 2008, ZHOU et al. 2009)

Mezi jednotlivými vzorky nádorů stejného typu byly znatelné rozdíly v metylacích promotorů tumor supresorových genů, což může být způsobeno tím, že metylace v těchto tumorech není konzistentní nebo tím, že různé nádory stejného druhu

byly resekovány v různých stádiích. Z klastrové analýzy je zřejmé, že v těchto tumorech není hypermetylováno velké množství tumor supresorových genů.

### 6.3 Array-CGH

Chromozomální ztráty a zisky jsou charakteristickým znakem řady renálních karcinomů a lze je část podle nich identifikovat. Tyto ztráty jsou u řady běžných RK známé, u vzácnějších tomu tak není.

#### 6.3.1 Příklad A

Pseudorozetový karcinom s translokací t(6;11) je velmi vzácný tumor, jehož bylo v literatuře popsáno jen několik případů. Charakteristické aberace vedle translokace t(6;11) pro tento tumor prozatím nebyly zjištěny. Pouze DAVIS et al. (2003) popsal cytogeneticky karyotyp jedné pacientky jako 46, XX, t(6;11)(p21;q12).

U tumoru z této studie byla molekulárně geneticky zjištěna translokace t(6;11) a dále nepřítomnost mutací VHL a nepřítomnost metylace VHL (PETERSSON et al. 2011). Vedle těchto molekulárně genetických charakteristik, aCGH spolu s LOH analýzou odhalila ztrátu 1p35.1-1p36.21 a ztrátu 22q.

Ztráta 1p36 byla v renálních karcinomech identifikována ve 2/27 renálních onkocytomech (PANER et al. 2007). Mimo renální karcinomy byla tato aberace identifikována např. u Ewingova sarkomu (HATTINGER et al. 1999), nádorů plic (YANADA et al. 2005), neuroblastomů (SCHLEIERMACHER et al. 1995) a u feochromocytomů (SANDGREN et al. 2010), což naznačuje přítomnost tumor supresorových genů v této oblasti, za všechny jmenujme například *TP73* (MARTINEZ-DELGADO et al. 2002) a *RUNX3* (ZHANG et al. 2009).

Monosomie chromozomu 22 byla pozorována u „low-grade tubular-mucinous renal carcinoma“ (RAKOZY et al. 2002) a u maligní renální neoplázie z vřetenitých buněk odpovídající zapouzdřenému nádoru periferního nervu (SCIOT et al. 1995).

SCHWERDTLE et al. (1996) zpozoroval monosomie (LOH) 22q u 4/19 SRK, 1/8 CHRK a u 1/10 chromofilních RK.

Pokud je mi známo, nebyly dodnes u renálních karcinomů společné aberace 1p36 del a 22q del. Tyto změny byly společně (a bez dalších aberací) popsány pouze u pacientek s endometriózou (GOGUSEV et al. 1999) a u několika málo pacientů s meningiomy (PFISTERER et al. 2004).

Pokud je známo, tak toto je první studie, ve které byly identifikovány chromozomální aberace u translokačního tumoru t(6;11)(p21;q12). Bude však zapotřebí více studií pro určení, zda ztráty 1p35.1-1p36.21 a 22q jsou pravidlem či výjimkou.

### 6.3.2 Příklad B a C

Dalšími vzorky, zpracovanými v této studii pomocí aCGH s FISH konfirmací, které vykazovaly neurčité avšak naprosto odlišné morfologické znaky. U vzorku B byly identifikovány ztráty 1p36.23-pter, 14q11.1-q32.11, ztráta celého chromozomu 19 a ztráty 21q21.2-pter a 22q a u vzorku C ztráty 1p36.13-pter, 14q, ztráta celého chromozomu 19, a ztráty 21q21.1-qter a 22q11.1-q12.2. Výskyt takto podobných aberací u dvou neidentifikovatelných tumorů s takto odlišnými morfologickými znaky je velmi neočekávaný a je otázkou, zda tyto tumory tvoří na základě genetické podobnosti další podskupinu renálních karcinomů, ačkoliv jsou morfologicky rozdílné, či zda došlo k náhodné konvergenci.

Ztráty 1p36 a 22q byly diskutovány výše včetně výskytu u RK a dalších tumorů a možností přítomnosti tumor supresorových genů v těchto oblastech.

Ztráta chromozomu 14 byla, stejně jako v případě 1p36, pozorována u renálních onkocytomů a to u 4/8 případů (FÜZESI et al. 2005) a dále u „low-grade tubular-mucinous renal carcinoma“ (RAKOZY et al. 2002).

Ztráta chromozomu 19 byla popsána u světlobuněčného sarkomu ledviny (SCHUSTER et al. 2003).

Ztráta chromozomu 21 je poměrně častou aberací u CHRK (KOVACS a KOVACS 1992, IQBAL et al. 2000), dále se vyskytuje u onkocytomů (PANER et al. 2007).

Pokud je známo, tak tyto jedinečné aberace se společně u RK a dost možná i u jiných tumorů dosud nevyskytly.

#### **6.4 Detekce *FOXL2* mutace c.402C>G**

Na základě analýzy těchto vzácných testikulárních tumorů se zdá, že mutace c.402C>G *FOXL2* často se nalézající u ovariálních tumorů, nehraje důležitou roli ve vývoji testikulárních ATGCT tumorů a ISCST. Imunohistochemická pozitivita *FOXL2* u těchto tumorů, zjištěná v naší laboratoři (HES et al. 2011), může být způsobena jinými mutacemi nacházejícími se v samotném genu *FOXL2* nebo v jiném genu, který *FOXL2* reguluje.

Tyto výsledky potvrzují, že mutace *FOXL2* c.402C>G může sloužit jako diferenčně diagnostický marker pro ovariální typ ATGCT, avšak nikoliv pro testikulární ATGCT a ISCST.

## 7 Souhrn

Analýzou hladin mRNA vybraných genů u tubulocystických renálních karcinomů nebyla detekována zvýšená aktivita signálních drah spojených s angiogenezí, což naznačuje nevhodnost používání dostupných antiangiogenních terapeutik pro léčbu tohoto onemocnění.

Analýzou metylačních profilů 24 tumor supresorových genů u TRK a PRK byla zjištěna podobnost mezi těmito typy tumorů.

Detekce chromozomálních aberací pomocí aCGH u pseudorozetového renálního karcinomu a dvou neklasifikovatelných renálních karcinomů odhalila unikátní aberace u těchto tumorů. Zajímavostí byly, vzhledem k morfologické odlišnosti, téměř shodné chromozomální aberace u neklasifikovatelných RK.

Analýzou mutace c.402C>G genu *FOXL2* bylo přispěno k teorii, že lze tuto mutaci použít v diferenciální diagnostice jako průkaz ovarálního ATGCT.



## 8 Seznam citované literatury

- Advani, S.H. (2010): Targeting mTOR pathway: A new concept in cancer therapy. *Indian J Med Paediatr Oncol* **31**: 132-136.
- Ahmad, T. & Eisen, T. (2004): Kinase inhibition with BAY 43-9006 in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 6388S-6392S.
- Alam, H., Weck, J., Maizels, E., Park, Y., Lee, E.J., Ashcroft, M. & Hunzicker-Dunn, M. (2009): Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **150**: 915-928.
- Alcamo, E., Mizgerd, J., Horwitz, B., Bronson, R., Beg, A., Scott, M., Doerschuk, C., Hynes, R. & Baltimore, D. (2001): Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J Immunol* **167**: 1592-1600.
- Allen, N.P., Donniger, H., Vos, M.D., Eckfeld, K., Hesson, L., Gordon, L., Birrer, M.J., Latif, F. & Clark, G.J. (2007): RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors. *Oncogene* **26**: 6203-6211.
- Amin, M.B., MacLennan, G.T., Gupta, R., Grignon, D., Paraf, F., Vieillefond, A., Paner, G.P., Stovsky, M., Young, A.N., Srigley, J.R. & Cheville, J.C. (2009): Tubulocystic carcinoma of the kidney: clinicopathologic analysis of 31 cases of a distinctive rare subtype of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* **33**: 384-392.
- Anandappa, G., Hollingdale, A. & Eisen, T. (2010): Everolimus - a new approach in the treatment of renal cell carcinoma. *Cancer Manag Res* **2**: 61-70.
- Arai, E. & Kanai, Y. (2010): Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* **4**: 58-73.
- Arai, E., Wakai-Ushijima, S., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Yokoi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S. & Kanai, Y. (2011): Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology* **78**: 1-9.
- Argani, P., Hawkins, A., Griffin, C.A., Goldstein, J.D., Haas, M., Beckwith, J.B., Mankinen, C.B. & Perlman, E.J. (2001): A distinctive pediatric renal neoplasm characterized by epithelioid morphology, basement membrane production, focal HMB45 immunoreactivity, and t(6;11)(p21.1;q12) chromosome translocation. *Am J Pathol* **158**: 2089-2096.

- Armah, H.B., Parwani, A.V., Surti, U. & Bastacky, S.I. (2009): Xp11.2 translocation renal cell carcinoma occurring during pregnancy with a novel translocation involving chromosome 19: a case report with review of the literature. *Diagn Pathol* **4**: 15.
- Azoulay, S., Vieillefond, A., Paraf, F., Pasquier, D., Cussenot, O., Callard, P. & Sibony, M. (2007): Tubulocystic carcinoma of the kidney: a new entity among renal tumors. *Virchows Arch* **451**: 905-909.
- Bae, S.C. & Choi, J.K. (2004): Tumor suppressor activity of RUNX3. *Oncogene* **23**: 4336-4340.
- Baldewijns, M.M., van Vlodrop, I.J., Schouten, L.J., Soetekouw, P.M., de Bruïne, A.P. & van Engeland, M. (2008): Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochim Biophys Acta* **1785**: 133-155.
- Barrena Medel, N.I., Herzog, T.J., Wright, J.D. & Lewin, S.N. (2010): Neoadjuvant bevacizumab in a granulosa cell tumor of the ovary: a case report. *Anticancer Res* **30**: 4767-4768.
- Beg, A., Sha, W., Bronson, R., Ghosh, S. & Baltimore, D. (1995): Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**: 167-170.
- Bell, G.I., Fong, N.M., Stempien, M.M., Wormsted, M.A., Caput, D., Ku, L.L., Urdea, M.S., Rall, L.B. & Sanchez-Pescador, R. (1986): Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acids Res* **14**: 8427-8446.
- Bertout, J.A., Majmundar, A.J., Gordan, J.D., Lam, J.C., Ditsworth, D., Keith, B., Brown, E.J., Nathanson, K.L. & Simon, M.C. (2009): HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14391-14396.
- Beysen, D., De Jaegere, S., Amor, D., Bouchard, P., Christin-Maitre, S., Fellous, M., Touraine, P., Grix, A.W., Hennekam, R., Meire, F., Oyen, N., Wilson, L.C., Barel, D., Clayton-Smith, J., de Ravel, T., Decock, C., Delbeke, P., Ensenaer, R., Ebinger, F., Gillessen-Kaesbach, G., Hendriks, Y., Kimonis, V., Laframboise, R., Laissue, P., Leppig, K., Leroy, B.P., Miller, D.T., Mowat, D., Neumann, L., Plomp, A., Van Regemorter, N., Wiczorek, D., Veitia, R.A., De Paepe, A. & De Baere, E. (2008): Identification of 34 novel and 56 known FOXL2 mutations in patients with Blepharophimosis syndrome. *Hum Mutat* **29**: E205-219.
- Blancher, C., Moore, J., Robertson, N. & Harris, A. (2001): Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res* **61**: 7349-7355.

- Boulay, A., Zumstein-Mecker, S., Stephan, C., Beuvink, I., Zilbermann, F., Haller, R., Tobler, S., Heusser, C., O'Reilly, T., Stolz, B., Marti, A., Thomas, G. & Lane, H.A. (2004): Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res* **64**: 252-261.
- Bretheau, D., Lechevallier, E., Eghazarian, C., Grisoni, V. & Coulange, C. (1995): Prognostic significance of incidental renal cell carcinoma. *Eur Urol* **27**: 319-323.
- Brown, J.A., Takahashi, S., Alcaraz, A., Borell, T.J., Anderl, K.L., Qian, J., Persons, D.L., Bostwick, D.G., Lieber, M.M. & Jenkins, R.B. (1996): Fluorescence in situ hybridization analysis of renal oncocytoma reveals frequent loss of chromosomes Y and 1. *J Urol* **156**: 31-35.
- Bruick, R. & McKnight, S. (2001): A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**: 1337-1340.
- Burbee, D.G., Forgacs, E., Zöchbauer-Müller, S., Shivakumar, L., Fong, K., Gao, B., Randle, D., Kondo, M., Virmani, A., Bader, S., Sekido, Y., Latif, F., Milchgrub, S., Toyooka, S., Gazdar, A.F., Lerman, M.I., Zabarovsky, E., White, M. & Minna, J.D. (2001): Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* **93**: 691-699.
- Calipel, A., Abonnet, V., Nicole, O., Mascarelli, F., Coupland, S., Damato, B.E. & Mouriaux, F. (2011): Status of RASSF1A in uveal melanocytes and melanoma cells. *Mol Cancer Res*.
- Chen, D., Li, M., Luo, J. & Gu, W. (2003): Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* **278**: 13595-13598.
- Chen, P.C., Tsai, M.H., Yip, S.K.h., Jou, Y.C., Ng, C.F., Chen, Y., Wang, X., Huang, W., Tung, C.L., Chen, G.C., Huang, M.M., Tong, J.H., Song, E.J., Chang, D.C., Hsu, C.D., To, K.F., Shen, C.H. & Chan, M.W. (2011): Distinct DNA methylation epigenotypes in bladder cancer from different Chinese sub-populations and its implication in cancer detection using voided urine. *BMC Med Genomic*, **4**: 45.
- Chen, Y.J., Tang, Q.B. & Zou, S.Q. (2005): Inactivation of RASSF1A, the tumor suppressor gene at 3p21.3 in extrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* **11**: 1333-1338.
- Chi, X.Z., Kim, J., Lee, Y.H., Lee, J.W., Lee, K.S., Wee, H., Kim, W.J., Park, W.Y., Oh, B.C., Stein, G.S., Ito, Y., van Wijnen, A.J. & Bae, S.C. (2009): Runt-related transcription factor RUNX3 is a target of MDM2-mediated ubiquitination. *Cancer Res* **69**: 8111-8119.

- Chou, Y.T., Lin, H.H., Lien, Y.C., Wang, Y.H., Hong, C.F., Kao, Y.R., Lin, S.C., Chang, Y.C., Lin, S.Y., Chen, S.J., Chen, H.C., Yeh, S.D. & Wu, C.W. (2010): EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res* **70**: 8822-8831.
- Choufani, S., Shuman, C. & Weksberg, R. (2010): Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **154C**: 343-354.
- Chow, W., Devesa, S., Warren, J. & Fraumeni, J.J. (1999): Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* **281**: 1628-1631.
- Chua, I.S., Tan, K.T., Lim-Tan, S.K. & Ho, T.H. (2001): A clinical review of granulosa cell tumours of the ovary cases in KKH. *Singapore Med J* **42**: 203-207.
- Cicenas, J. (2008): The potential role of Akt phosphorylation in human cancers. *Int J Biol Markers* **23**: 1-9.
- Cockman, M., Masson, N., Mole, D., Jaakkola, P., Chang, G., Clifford, S., Maher, E., Pugh, C., Ratcliffe, P. & Maxwell, P. (2000): Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **275**: 25733-25741.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Serval, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M. & Veitia, R.A. (2002): Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet* **39**: 916-921.
- Costa, V.L., Henrique, R., Ribeiro, F.R., Pinto, M., Oliveira, J., Lobo, F., Teixeira, M.R. & Jerónimo, C. (2007): Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. *BMC Cancer* **7**: 133.
- Crispen, P.L., Lohse, C.M. & Blute, M.L. (2008): Multifocal renal cell carcinoma: clinicopathologic features and outcomes for tumors  $\leq 4$  cm. *Adv Urol* 518091.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M.S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A. & Pilia, G. (2001): The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* **27**: 159-166.
- D'Andrea, M.R. & Gasparini, G. (2007): The future of anti-EGFR therapy. *Int J Biol Markers* **22**: S88-93.
- Dameron, K., Volpert, O., Tainsky, M. & Bouck, N. (1994): Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* **265**: 1582-1584.

- Damert, A., Ikeda, E. & Risau, W. (1997): Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J* **327** ( Pt 2): 419-423.
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S. & Pfeifer, G.P. (2000): Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* **25**: 315-319.
- Davis, I.J., Hsi, B.L., Arroyo, J.D., Vargas, S.O., Yeh, Y.A., Motyckova, G., Valencia, P., Perez-Atayde, A.R., Argani, P., Ladanyi, M., Fletcher, J.A. & Fisher, D.E. (2003): Cloning of an Alpha-TFEB fusion in renal tumors harboring the t(6;11)(p21;q13) chromosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6051-6056.
- Davis, S.J., Choong, D.Y., Ramakrishna, M., Ryland, G.L., Campbell, I.G. & Gorringer, K.L. (2011): Analysis of the Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAP2K4) tumor suppressor gene in ovarian cancer. *BMC Cancer* **11**: 173.
- De Baere, E., Beysen, D., Oley, C., Lorenz, B., Cocquet, J., De Sutter, P., Devriendt, K., Dixon, M., Fellous, M., Fryns, J.P., Garza, A., Jonsrud, C., Koivisto, P.A., Krause, A., Leroy, B.P., Meire, F., Plomp, A., Van Maldergem, L., De Paepe, A., Veitia, R. & Messiaen, L. (2003): FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* **72**: 478-487.
- De Baere, E., Dixon, M.J., Small, K.W., Jabs, E.W., Leroy, B.P., Devriendt, K., Gillerot, Y., Mortier, G., Meire, F., Van Maldergem, L., Courtens, W., Hjalgrim, H., Huang, S., Liebaers, I., Van Regemorter, N., Touraine, P., Praphanphoj, V., Verloes, A., Udar, N., Yellore, V., Chalukya, M., Yelchits, S., De Paepe, A., Kuttann, F., Fellous, M., Veitia, R. & Messiaen, L. (2001): Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype--phenotype correlation. *Hum Mol Genet* **10**: 1591-1600.
- de Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. & Williams, L.T. (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**: 989-991.
- Donninger, H., Vos, M.D. & Clark, G.J. (2007): The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci* **120**: 3163-3172.
- Drucker, B.J. (2005): Renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer Treat Rev* **31**: 536-545.
- Dulaimi, E., Ibanez de Caceres, I., Uzzo, R.G., Al-Saleem, T., Greenberg, R.E., Polascik, T.J., Babb, J.S., Grizzle, W.E. & Cairns, P. (2004): Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 3972-3979.

- Dávalos-Salas, M., Furlan-Magaril, M., González-Buendía, E., Valdes-Quezada, C., Ayala-Ortega, E. & Recillas-Targa, F. (2011): Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human retinoblastoma gene promoter. *BMC Cancer* **11**: 232.
- Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A., Eds. (2004): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, IARC Press, Lyon.
- Ellinger, J., Holl, D., Nuhn, P., Kahl, P., Haseke, N., Staehler, M., Siegert, S., Hauser, S., Stief, C.G., Müller, S.C. & Bastian, P.J. (2011): DNA hypermethylation in papillary renal cell carcinoma. *BJU Int* **107**: 664-669.
- Ellouze, S., Krichen-Makni, S., Trabelsi, K., Ayadi, L., Sellami, A., Khabir, A., Hammami, S., Mnif, H. & Sellami-Boudawara, T. (2006): [Granulosa-cell tumor of the ovary: report of 16 cases]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **35**: 767-772.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. & Fujii-Kuriyama, Y. (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4273-4278.
- Epstein, A., Gleadle, J., McNeill, L., Hewitson, K., O'Rourke, J., Mole, D., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M., Dhanda, A., Tian, Y., Masson, N., Hamilton, D., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P., Pugh, C., Schofield, C. & Ratcliffe, P. (2001): *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**: 43-54.
- Escudier, B., Bellmunt, J., Négrier, S., Bajetta, E., Melichar, B., Bracarda, S., Ravaud, A., Golding, S., Jethwa, S. & Sneller, V. (2010): Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol* **28**: 2144-2150.
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W.M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A.A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T.E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R., Bukowski, R.M. & Group, T.S. (2007): Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**: 125-134.
- Esteban, M., Tran, M., Harten, S., Hill, P., Castellanos, M., Chandra, A., Raval, R., O'Brien, T. & Maxwell, P. (2006): Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res* **66**: 3567-3575.

- Evans, A., Russell, R., Roche, O., Burry, T., Fish, J., Chow, V., Kim, W., Saravanan, A., Maynard, M., Gervais, M., Sufan, R., Roberts, A., Wilson, L., Betten, M., Vandewalle, C., Berx, G., Marsden, P., Irwin, M., Teh, B., Jewett, M. & Ohh, M. (2007): VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol Cell Biol* **27**: 157-169.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D.M. (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**: 2893-2917.
- Fisher, K.E., Sacharidou, A., Stratman, A.N., Mayo, A.M., Fisher, S.B., Mahan, R.D., Davis, M.J. & Davis, G.E. (2009): MT1-MMP- and Cdc42-dependent signaling co-regulate cell invasion and tunnel formation in 3D collagen matrices. *J Cell Sci* **122**: 4558-4569.
- Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, **82**, 4-6.
- Fujishita, T., Aoki, K., Lane, H.A., Aoki, M. & Taketo, M.M. (2008): Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in ApcDelta716 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13544-13549.
- Fyfe, G., Fisher, R.I., Rosenberg, S.A., Sznol, M., Parkinson, D.R. & Louie, A.C. (1995): Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* **13**: 688-696.
- Füzesi, L., Cober, M. & Mittermayer, C. (1992): Collecting duct carcinoma: cytogenetic characterization. *Histopathology* **21**: 155-160.
- Füzesi, L., Frank, D., Nguyen, C., Ringert, R., Bartels, H. & Gunawan, B. (2005): Losses of 1p and chromosome 14 in renal oncocytomas. *Cancer Genet Cytogenet* **160**: 120-125.
- Garrido, C., Saule, S. & Gospodarowicz, D. (1993): Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors* **8**: 109-117.
- Gervais, M., Henry, P., Saravanan, A., Burry, T., Gallie, B., Jewett, M., Hill, R., Evans, A. & Ohh, M. (2007): Nuclear E-cadherin and VHL immunoreactivity are prognostic indicators of clear-cell renal cell carcinoma. *Lab Invest* **87**: 1252-1264.
- Glenn, S.T., Jones, C.A., Liang, P., Kaushik, D., Gross, K.W. & Kim, H.L. (2007): Expression profiling of archival renal tumors by quantitative PCR to validate prognostic markers. *Biotechniques* **43**: 639-640, 642-633, 647.
- Gogusev, J., Bouquet de Jolinière, J., Telvi, L., Doussau, M., du Manoir, S., Stojkoski, A. & Levardon, M. (1999): Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* **105**: 444-451.

- Gonzalzo, M.L., Yegnasubramanian, S., Yan, G., Rogers, C.G., Nicol, T.L., Nelson, W.G. & Pavlovich, C.P. (2004): Molecular profiling and classification of sporadic renal cell carcinoma by quantitative methylation analysis. *Clin Cancer Res* **10**: 7276-7283.
- Gordan, J. & Simon, M. (2007): Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* **17**: 71-77.
- Groenestege, W.M., Thébault, S., van der Wijst, J., van den Berg, D., Janssen, R., Tejpar, S., van den Heuvel, L.P., van Cutsem, E., Hoenderop, J.G., Knoers, N.V. & Bindels, R.J. (2007): Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J Clin Invest* **117**: 2260-2267.
- Gönül, I.I., Cakr, A., Sözen, S., Ataoglu, O. & Alkibay, T. (2009): A case of tubulocystic carcinoma simultaneously occurring with clear cell type renal cell carcinoma and micropapillary urothelial carcinoma of bladder. *South Med J* **102**: 754-757.
- Hagenkord, J., Parwani, A., Lyons-Weiler, M., Alvarez, K., Amato, R., Gatalica, Z., Gonzalez-Berjon, J., Peterson, L., Dhir, R. & Monzon, F. (2008): Virtual karyotyping with SNP microarrays reduces uncertainty in the diagnosis of renal epithelial tumors. *Diagn Pathol* **3**: 44.
- Harris, S.E., Chand, A.L., Winship, I.M., Gersak, K., Aittomäki, K. & Shelling, A.N. (2002): Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* **8**: 729-733.
- Hattinger, C.M., Rumpler, S., Strehl, S., Ambros, I.M., Zoubek, A., Pötschger, U., Gardner, H. & Ambros, P.F. (1999): Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **24**: 243-254.
- Hernandez, L., Fest, T., Cazorla, M., Teruya-Feldstein, J., Bosch, F., Peinado, M.A., Piris, M.A., Montserrat, E., Cardesa, A., Jaffe, E.S., Campo, E. & Raffeld, M. (1996): p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* **87**: 3351-3359.
- Hes, O., Brunelli, M., Michal, M., Cossu Rocca, P., Hora, M., Chilosi, M., Mina, M., Boudova, L., Menestrina, F. & Martignoni, G. (2006): Oncocytic papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, ultrastructural, and interphase cytogenetic study of 12 cases. *Ann Diagn Pathol* **10**: 133-139.
- Hes, O., Michal, M., Mukenšabl, P., Veličkinová, H., Hora, M., Boudová, L. (2007): Nádory Varlat, 1. vydání. Euroverlag, Plzeň.
- Hes, O., Michal, M., Sulc, M., Kocová, L., Hora, M. & Rousarová, M. (1998): Glassy hyaline globules in granular cell carcinoma, chromophobe cell carcinoma, and oncocytoma of the kidney. *Ann Diagn Pathol* **2**: 12-18.



- Hes, O., Vaněček, T., Petersson, F., Grossmann, P., Hora, M., Perez Montiel, D.M., Steiner, P., Dvořák, M. & Michal, M. (2011): 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* **19**: 347-351.
- Hines, J.F., Khalifa, M.A., Moore, J.L., Fine, K.P., Lage, J.M. & Barnes, W.A. (1996): Recurrent granulosa cell tumor of the ovary 37 years after initial diagnosis: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol* **60**: 484-488.
- Hora, M., Urge, T., Eret, V., Stránský, P., Klečka, J., Kreuzberg, B., Ferda, J., Hyršl, L., Breza, J., Holečková, P., Mego, M., Michal, M., Petersson, F. & Hes, O. (2010): Tubulocystic renal carcinoma: a clinical perspective. *World J Urol* **3**: 349-354.
- Huang, D., Ding, Y., Li, Y., Luo, W.M., Zhang, Z.F., Snider, J., Vandenbeldt, K., Qian, C.N. & Teh, B.T. (2010): Sunitinib acts primarily on tumor endothelium rather than tumor cells to inhibit the growth of renal cell carcinoma. *Cancer Res* **70**: 1053-1062.
- Huang, J.H. & Zhou, F.J. (2008): [Research advances in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma]. *Ai Zheng* **27**: 1006-1008.
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z., Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I.G., Barbarash, O., Gokmen, E., O'Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., Motzer, R.J. & Trial, G.A. (2007): Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**: 2271-2281.
- Hudson, C.C., Liu, M., Chiang, G.G., Otterness, D.M., Loomis, D.C., Kaper, F., Giaccia, A.J. & Abraham, R.T. (2002): Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* **22**: 7004-7014.
- Hurwitz, H.I., Dowlati, A., Saini, S., Savage, S., Suttle, A.B., Gibson, D.M., Hodge, J.P., Merkle, E.M. & Pandite, L. (2009): Phase I trial of pazopanib in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 4220-4227.
- Iqbal, M.A., Akhtar, M., Ulmer, C., Al-Dayel, F. & Paterson, M.C. (2000): FISH analysis in chromophobe renal-cell carcinoma. *Diagn Cytopathol* **22**: 3-6.
- Iyevleva, A.G., Novik, A.V., Moiseyenko, V.M. & Imyanitov, E.N. (2009): EGFR mutation in kidney carcinoma confers sensitivity to gefitinib treatment: a case report. *Urol Oncol* **27**: 548-550.
- Jaakkola, P., Mole, D., Tian, Y., Wilson, M., Gielbert, J., Gaskell, S., Kriegsheim Av, Hebestreit, H., Mukherji, M., Schofield, C., Maxwell, P., Pugh, C. & Ratcliffe, P. (2001): Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468-472.

- Johnson, J.L., Fenton, S. & Sheffield, L.G. (1996): Prolactin inhibits epidermal growth factor-induced Ras-MAPK signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **271**: 21574-21578.
- Kageyama, Y., Sugiyama, H., Ayame, H., Iwai, A., Fujii, Y., Huang, L.E., Kizaka-Kondoh, S., Hiraoka, M. & Kihara, K. (2006): Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells by pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element. *Acta Oncol* **45**: 317-324.
- Kapoor, A. (2009): Inhibition of mTOR in kidney cancer. *Curr Oncol* **16 Suppl 1**: S33-39.
- Keith, B., Adelman, D. & Simon, M. (2001): Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6692-6697.
- Kim, M.S., Hur, S.Y., Yoo, N.J. & Lee, S.H. (2010): Mutational analysis of FOXL2 codon 134 in granulosa cell tumour of ovary and other human cancers. *J Pathol* **221**: 147-152.
- Klener, P. (2002): Angiogeneze a nádorová onemocnění. *Remedia Online* 1/2002: 2-8.
- Knauth, K., Bex, C., Jemth, P. & Buchberger, A. (2006): Renal cell carcinoma risk in type 2 von Hippel-Lindau disease correlates with defects in pVHL stability and HIF-1alpha interactions. *Oncogene* **25**: 370-377.
- Komai, Y., Fujiwara, M., Fujii, Y., Mukai, H., Yonese, J., Kawakami, S., Yamamoto, S., Migita, T., Ishikawa, Y., Kurata, M., Nakamura, T. & Fukui, I. (2009): Adult Xp11 translocation renal cell carcinoma diagnosed by cytogenetics and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* **15**: 1170-1176.
- Kovacs, A. & Kovacs, G. (1992): Low chromosome number in chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **4**: 267-268.
- Kovacs, G., Fuzesi, L., Emanuel, A. & Kung, H.F. (1991): Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **3**: 249-255.
- Kuiper, R.P., Schepens, M., Thijssen, J., van Asseldonk, M., van den Berg, E., Bridge, J., Schuurin, E., Schoenmakers, E.F. & van Kessel, A.G. (2003): Upregulation of the transcription factor TFEB in t(6;11)(p21;q13)-positive renal cell carcinomas due to promoter substitution. *Hum Mol Genet* **12**: 1661-1669.
- Kumar, R., Knick, V.B., Rudolph, S.K., Johnson, J.H., Crosby, R.M., Crouthamel, M.C., Hopper, T.M., Miller, C.G., Harrington, L.E., Onori, J.A., Mullin, R.J., Gilmer, T.M., Truesdale, A.T., Epperly, A.H., Bolor, A., Stafford, J.A., Luttrell, D.K. & Cheung, M. (2007): Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Mol Cancer Ther* **6**: 2012-2021.

- Kwon, Y.W., Kwon, K.S., Moon, H.E., Park, J.A., Choi, K.S., Kim, Y.S., Jang, H.S., Oh, C.K., Lee, Y.M., Kwon, Y.G., Lee, Y.S. & Kim, K.W. (2004): Insulin-like growth factor-II regulates the expression of vascular endothelial growth factor by the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Invest Dermatol* **123**: 152-158.
- Köbel, M., Gilks, C.B. & Huntsman, D.G. (2009): Adult-type granulosa cell tumors and FOXL2 mutation. *Cancer Res* **69**: 9160-9162.
- Lai, T.Y., Su, C.C., Kuo, W.W., Yeh, Y.L., Kuo, W.H., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Weng, Y.J., Huang, C.Y. & Chen, L.M. (2011):  $\beta$ -catenin plays a key role in metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* **26**: 415-422.
- Lang, J.M. & Harrison, M.R. (2010): Pazopanib for the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Med Insights Oncol* **4**: 95-105.
- Latham, B., Dickersin, G.R. & Oliva, E. (1999): Subtypes of chromophobe cell renal carcinoma: an ultrastructural and histochemical study of 13 cases. *Am J Surg Pathol* **23**: 530-535.
- Le Tourneau, C., Faivre, S., Serova, M. & Raymond, E. (2008): mTORC1 inhibitors: is temsirolimus in renal cancer telling us how they really work? *Br J Cancer* **99**: 1197-1203.
- Lee, J.J. & Chu, E. (2007): First-line use of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* **6 Suppl 2**: S42-46.
- Lefèvre, M., Couturier, J., Sibony, M., Bazille, C., Boyer, K., Callard, P., Vieillefond, A. & Allory, Y. (2005): Adult papillary renal tumor with oncocytic cells: clinicopathologic, immunohistochemical, and cytogenetic features of 10 cases. *Am J Surg Pathol* **29**: 1576-1581.
- Li, C., Dong, J., Chen, M.Q., Li, W.L., Ren, J.Y., Chen, S.X., Li, Q.T., Geng, J.W., Miao, Y.D. & Yang, J. (2011): [Effects of CDH1 gene promoter methylation on expression of E-cadherin and beta-catenin and its clinicopathological significance in colon carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* **14**: 538-541.
- Li, M., Liu, H., Xu, Z.F., Liu, X.R., Wang, Y., Rao, Q., Wang, J.X. & Wang, M. (2008a): [Promoter methylation status of PTEN gene and the effect of induced demethylation in leukemia cell lines]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **29**: 289-292.
- Li, X., Zhang, Y., Qiao, T., Wu, K., Ding, J., Liu, J. & Fan, D. (2008b): RUNX3 inhibits growth of HCC cells and HCC xenografts in mice in combination with adriamycin. *Cancer Biol Ther* **7**: 669-676.
- Liao, D. & Johnson, R. (2007): Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 281-290.

- Liotta, L.A. & Stetler-Stevenson, W.G. (1990): Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* **1**: 99-106.
- MacLennan, G.T., Farrow, G.M. & Bostwick, D.G. (1997): Low-grade collecting duct carcinoma of the kidney: report of 13 cases of low-grade mucinous tubulocystic renal carcinoma of possible collecting duct origin. *Urology* **50**: 679-684.
- Maier, H.J., Schmidt-Strassburger, U., Huber, M.A., Wiedemann, E.M., Beug, H. & Wirth, T. (2010): NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett* **295**: 214-228.
- Malouf, G.G., Camparo, P., Oudard, S., Schleiermacher, G., Theodore, C., Rustine, A., Dutcher, J., Billemon, B., Rixe, O., Bompas, E., Guillot, A., Boccon-Gibod, L., Couturier, J., Molinié, V. & Escudier, B. (2010): Targeted agents in metastatic Xp11 translocation/TFE3 gene fusion renal cell carcinoma (RCC): a report from the Juvenile RCC Network. *Ann Oncol* **21**: 1834-1838.
- Malpeli, G., Amato, E., Dandrea, M., Fumagalli, C., Debattisti, V., Boninsegna, L., Pelosi, G., Falconi, M. & Scarpa, A. (2011): Methylation-associated down-regulation of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C in pancreatic endocrine tumors. *BMC Cancer* **11**: 351.
- Maltepe, E., Schmidt, J., Baunoch, D., Bradfield, C. & Simon, M. (1997): Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* **386**: 403-407.
- Martinez-Delgado, B., Melendez, B., Cuadros, M., Jose Garcia, M., Nomdedeu, J., Rivas, C., Fernandez-Piqueras, J. & Benítez, J. (2002): Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer* **102**: 15-19.
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P., Pugh, C. & Ratcliffe, P. (2001): Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* **20**: 5197-5206.
- Maynard, M. & Ohh, M. (2004): Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol* **24**: 1-13.
- Mego, M., Sycova-Mila, Z., Rejlekova, K., Rychly, B., Obertova, J., Rajec, J., Hes, O. & Mardiak, J. (2008): Sunitinib in the treatment of tubulocystic carcinoma of the kidney. A case report. *Ann Oncol* **19**: 1655-1656.
- Mendel, D.B., Laird, A.D., Xin, X., Louie, S.G., Christensen, J.G., Li, G., Schreck, R.E., Abrams, T.J., Ngai, T.J., Lee, L.B., Murray, L.J., Carver, J., Chan, E., Moss, K.G., Haznedar, J.O., Sukbuntherng, J., Blake, R.A., Sun, L., Tang, C., Miller, T., Shirazian, S., McMahon, G. & Cherrington, J.M. (2003): In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* **9**: 327-337.

- Meteoglu, I., Erdogdu, I., Meydan, N., Erkus, M. & Barutca, S. (2008): NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *J Exp Clin Cancer Res* **27**: 53.
- Michal, M., Hes, O., Mukenšabl, P. (2000): *Nádory Ledvin Dospělého Věku*. Euroverlag s.r.o., Plzeň.
- Miller, B.E., Barron, B.A., Wan, J.Y., Delmore, J.E., Silva, E.G. & Gershenson, D.M. (1997): Prognostic factors in adult granulosa cell tumor of the ovary. *Cancer* **79**: 1951-1955.
- Morais, C., Gobe, G., Johnson, D. & Healy, H. (2009): Anti-angiogenic actions of pyrrolidine dithiocarbamate, a nuclear factor kappa B inhibitor. *Angiogenesis* **12**: 365-379.
- Morrissey, C., Martinez, A., Zatyka, M., Agathangelou, A., Honorio, S., Astuti, D., Morgan, N.V., Moch, H., Richards, F.M., Kishida, T., Yao, M., Schraml, P., Latif, F. & Maher, E.R. (2001): Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* **61**: 7277-7281.
- MOSTOFI, F.K., THEISS, E.A. & ASHLEY, D.J. (1959): Tumors of specialized gonadal stroma in human male patients. Androblastoma, Sertoli cell tumor, granulosa-theca cell tumor of the testis, and gonadal stromal tumor. *Cancer* **12**: 944-957.
- Motzer, R.J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T.E., Porta, C., Bracarda, S., Grünwald, V., Thompson, J.A., Figlin, R.A., Hollaender, N., Urbanowitz, G., Berg, W.J., Kay, A., Lebwohl, D., Ravaud, A. & Group, R.-S. (2008): Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* **372**: 449-456.
- Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Pili, R., Bjarnason, G.A., Garcia-del-Muro, X., Sosman, J.A., Solska, E., Wilding, G., Thompson, J.A., Kim, S.T., Chen, I., Huang, X. & Figlin, R.A. (2009): Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **27**: 3584-3590.
- Muller, P.A., Vousden, K.H. & Norman, J.C. (2011): p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol* **192**: 209-218.
- Mure, H., Matsuzaki, K., Kitazato, K.T., Mizobuchi, Y., Kuwayama, K., Kageji, T. & Nagahiro, S. (2010): Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas. *Neuro Oncol* **12**: 221-232.
- Nyhan, M.J., El Mashad, S.M., O'Donovan, T.R., Ahmad, S., Collins, C., Sweeney, P., Rogers, E., O'Sullivan, G.C. & McKenna, S.L. (2010): VHL genetic alteration in CCRCC does not determine de-regulation of HIF, CAIX, hnRNP A2/B1 and osteopontin. *Anal Cell Pathol (Amst)* **33**: 121-132.

- Négrier, S. & Raymond, E. (2011): Antiangiogenic treatments and mechanisms of action in renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*.
- Oh, S.J., Kim, O., Lee, J.S., Kim, J.A., Kim, M.R., Choi, H.S., Shim, J.H., Kang, K.W. & Kim, Y.C. (2010): Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* **48**: 3227-3234.
- Ollmann, M., Young, L.M., Di Como, C.J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W.W., Buchman, A., Duyk, G., Friedman, L., Prives, C. & Kopczynski, C. (2000): Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* **101**: 91-101.
- Osunkoya, A.O., Young, A.N., Wang, W., Netto, G.J. & Epstein, J.I. (2009): Comparison of gene expression profiles in tubulocystic carcinoma and collecting duct carcinoma of the kidney. *Am J Surg Pathol* **33**: 1103-1106.
- Oya, M., Ohtsubo, M., Takayanagi, A., Tachibana, M., Shimizu, N. & Murai, M. (2001): Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* **20**: 3888-3896.
- Oya, M., Takayanagi, A., Horiguchi, A., Mizuno, R., Ohtsubo, M., Marumo, K., Shimizu, N. & Murai, M. (2003): Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **24**: 377-384.
- Pal, S., Datta, K. & Mukhopadhyay, D. (2001): Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res* **61**: 6952-6957.
- Pan, Z.G., Kashuba, V.I., Liu, X.Q., Shao, J.Y., Zhang, R.H., Jiang, J.H., Guo, C., Zabarovsky, E., Ernberg, I. & Zeng, Y.X. (2005): High frequency somatic mutations in RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* **4**: 1116-1122.
- Paner, G., Lindgren, V., Jacobson, K., Harrison, K., Cao, Y., Campbell, S., Flanigan, R. & Picken, M. (2007): High incidence of chromosome 1 abnormalities in a series of 27 renal oncocytomas: cytogenetic and fluorescence in situ hybridization studies. *Arch Pathol Lab Med* **131**: 81-85.
- Patard, J., Rioux-Leclercq, N., Masson, D., Zerrouki, S., Jouan, F., Collet, N., Dubourg, C., Lobel, B., Denis, M. & Fergelot, P. (2009): Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br J Cancer* **101**: 1417-1424.
- Pei, Z., Li, H., Guo, Y., Jin, Y. & Lin, D. (2010): Sodium selenite inhibits the expression of VEGF, TGFbeta(1) and IL-6 induced by LPS in human PC3 cells via TLR4-NF-(K)B signaling blockage. *Int Immunopharmacol* **10**: 50-56.

- Penault-Llorca, F., Bibeau, F., Arnould, L., Bralet, M.P., Rochaix, P. & Sabourin, J.C. (2005): [EGFR expression in colorectal cancer and role in tumorigenesis]. *Bull Cancer* **92**: S5-11.
- Petersson, F., Gatalica, Z., Grossmann, P., Perez Montiel, M.D., Alvarado Cabrero, I., Bulimbasic, S., Swatek, A., Straka, L., Tichy, T., Hora, M., Kuroda, N., Legendre, B., Michal, M. & Hes, O. (2010): Sporadic hybrid oncocytic/chromophobe tumor of the kidney: a clinicopathologic, histomorphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular cytogenetic study of 14 cases. *Virchows Arch* **456**: 355-365.
- Petersson, F., Vaněček, T., Michal, M., Martignoni, G., Brunelli, M., Halbhuber, Z., Spagnolo, D., Kuroda, N., Yang, X., Cabrero, I.A., Hora, M., Branžovský, J., Trivunic, S., Kacerovská, D., Šteiner, P., Hes, O (2011): A distinctive translocation carcinoma of the kidney, “rosette forming“, t(6;11), HMB45 positive renal tumor: a histomorphologic, immunohistochemical, ultrastructural and molecular genetic study of 4 cases. *Human Pathol* (in press).
- Petrella, B. & Brinckerhoff, C. (2006): Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Mol Cancer* **5**: 66.
- Petrella, B. & Brinckerhoff, C. (2009): PTEN suppression of YY1 induces HIF-2 activity in von-Hippel-Lindau-null renal-cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* **8**: 1389-1401.
- Petrella, B., Lohi, J. & Brinckerhoff, C. (2005): Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene* **24**: 1043-1052.
- Pfaffl, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Pfeifer, J.D., Arber, D.A., Fuller, C.E., Rajan Mariappan, M., Perry, A., Pang-Hsien Tu, Watson, M.A., Zehnbauer, B.A. (2006): *Molecular Genetic Testing in Surgical Pathology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Pfisterer, W.K., Hank, N.C., Preul, M.C., Hendricks, W.P., Puschel, J., Coons, S.W. & Scheck, A.C. (2004): Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. *Neuro Oncol* **6**: 290-299.
- Pillay, K., Lazarus, J. & Wainwright, H.C. (2003): Association of angiomyolipoma and oncocytoma of the kidney: a case report and review of the literature. *J Clin Pathol* **56**: 544-547.
- Pinto Marín, A., Redondo Sánchez, A., Espinosa Arranz, E., Zamora Auñón, P., Castelo Fernández, B. & González Barón, M. (2010): mTOR pathway inhibition in renal cell carcinoma. *Urol Oncol*.

- Podar, K., Tonon, G., Sattler, M., Tai, Y.T., Legouill, S., Yasui, H., Ishitsuka, K., Kumar, S., Kumar, R., Pandite, L.N., Hideshima, T., Chauhan, D. & Anderson, K.C. (2006): The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19478-19483.
- Prangsaengtong, O., Koizumi, K., Senda, K., Sakurai, H. & Saiki, I. (2011): eNOS and Hsp90 interaction directly correlates with cord formation in human lymphatic endothelial cells. *Lymphat Res Biol* **9**: 53-59.
- Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M. & Ferrara, N. (1997): Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* **57**: 4593-4599.
- Quinn, T.P., Peters, K.G., De Vries, C., Ferrara, N. & Williams, L.T. (1993): Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7533-7537.
- Rakozy, C., Schmahl, G.E., Bogner, S. & Störkel, S. (2002): Low-grade tubular-mucinous renal neoplasms: morphologic, immunohistochemical, and genetic features. *Mod Pathol* **15**: 1162-1171.
- Raval, R., Lau, K., Tran, M., Sowter, H., Mandriota, S., Li, J., Pugh, C., Maxwell, P., Harris, A. & Ratcliffe, P. (2005): Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* **25**: 5675-5686.
- Ravaud, A., Clermont, H., Pasticier, G., Smith, D., Vendrely, V., Maire, J.P. (2007): Epithelial growth factor receptor (EGFR) pathway and renal cell carcinoma. *Targ Oncol* **2** (2): 99-105.
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z., Sutter, C., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L., Madan, A., Semenza, G. & Bedi, A. (2000): Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* **14**: 34-44.
- Reu, F.J., Leaman, D.W., Maitra, R.R., Bae, S.I., Cherkassky, L., Fox, M.W., Rempinski, D.R., Beaulieu, N., MacLeod, A.R. & Borden, E.C. (2006): Expression of RASSF1A, an epigenetically silenced tumor suppressor, overcomes resistance to apoptosis induction by interferons. *Cancer Res* **66**: 2785-2793.
- Richards, F., Schofield, P., Fleming, S. & Maher, E. (1996): Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Mol Genet* **5**: 639-644.
- Richstone, L., Scherr, D.S., Reuter, V.R., Snyder, M.E., Rabbani, F., Kattan, M.W. & Russo, P. (2004): Multifocal renal cortical tumors: frequency, associated clinicopathological features and impact on survival. *J Urol* **171**: 615-620.



- Roy, S., Balasubramanian, S., Wang, J., Chandrashekhar, Y., Charboneau, R. & Barke, R. (2003): Morphine inhibits VEGF expression in myocardial ischemia. *Surgery* **134**: 336-344.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J. & Moorman, A.F. (2009): Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **37**: e45.
- Saldanha, G., Ghura, V., Potter, L. & Fletcher, A. (2004): Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol* **151**: 157-164.
- Sandgren, J., Diaz de Ståhl, T., Andersson, R., Menzel, U., Piotrowski, A., Nord, H., Bäckdahl, M., Kiss, N.B., Brauckhoff, M., Komorowski, J., Dralle, H., Hessman, O., Larsson, C., Akerström, G., Bruder, C., Dumanski, J.P. & Westin, G. (2010): Recurrent genomic alterations in benign and malignant pheochromocytomas and paragangliomas revealed by whole-genome array comparative genomic hybridization analysis. *Endocr Relat Cancer* **17**: 561-579.
- Schleiermacher, G., Peter, M., Michon, J., Zucker, J.M., Thomas, G., Magdelénat, H. & Delattre, O. (1995): A multiplex PCR assay for routine evaluation of deletion of the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma. *Eur J Cancer* **31A**: 535-538.
- Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.C. & Treier, M. (2004): The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* **131**: 933-942.
- Schuster, A.E., Schneider, D.T., Fritsch, M.K., Grundy, P. & Perlman, E.J. (2003): Genetic and genetic expression analyses of clear cell sarcoma of the kidney. *Lab Invest* **83**: 1293-1299.
- Schwerdtle, R.F., Störkel, S., Neuhaus, C., Brauch, H., Weidt, E., Brenner, W., Hohenfellner, R., Huber, C. & Decker, H.J. (1996): Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 17p, and 21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Res* **56**: 2927-2930.
- Sciot, R., Dal Cin, P., Fletcher, C.D., De Wever, I., De Vos, R., Van Damme, B. & Van den Berghe, H. (1995): Monosomy 22 in a malignant peripheral nerve sheath tumour of the kidney in childhood: a genetic link with other malignant paediatric renal neoplasms? *Histopathology* **27**: 373-376.
- Seizinger, B., Rouleau, G., Ozelius, L., Lane, A., Farmer, G., Lamiell, J., Haines, J., Yuen, J., Collins, D. & Majoor-Krakauer, D. (1988): Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* **332**: 268-269.
- Semenza, G. (2004): Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* **19**: 176-182.

- Shah, S.P., Köbel, M., Senz, J., Morin, R.D., Clarke, B.A., Wiegand, K.C., Leung, G., Zayed, A., Mehl, E., Kalloger, S.E., Sun, M., Giuliany, R., Yorlida, E., Jones, S., Varhol, R., Swenerton, K.D., Miller, D., Clement, P.B., Crane, C., Madore, J., Provencher, D., Leung, P., DeFazio, A., Khattra, J., Turashvili, G., Zhao, Y., Zeng, T., Glover, J.N., Vanderhyden, B., Zhao, C., Parkinson, C.A., Jimenez-Linan, M., Bowtell, D.D., Mes-Masson, A.M., Brenton, J.D., Aparicio, S.A., Boyd, N., Hirst, M., Gilks, C.B., Marra, M. & Huntsman, D.G. (2009): Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N Engl J Med* **360**: 2719-2729.
- Shaulian, E. & Karin, M. (2002): AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**: E131-136.
- Shelling, A.N. (2010): Premature ovarian failure. *Reproduction* **140**: 633-641.
- Shivakumar, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R. & White, M.A. (2002): The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* **22**: 4309-4318.
- Song, M.S., Song, S.J., Ayad, N.G., Chang, J.S., Lee, J.H., Hong, H.K., Lee, H., Choi, N., Kim, J., Kim, H., Kim, J.W., Choi, E.J., Kirschner, M.W. & Lim, D.S. (2004): The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* **6**: 129-137.
- Soussi, T., Kato, S., Levy, P.P. & Ishioka, C. (2005): Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat* **25**: 6-17.
- Spathis, A., Aga, E., Alepaki, M., Chranioti, A., Meristoudis, C., Panayiotides, I., Kassanos, D. & Karakitsos, P. (2011): Promoter Methylation of p16, hMLH1, and MGMT in Liquid-Based Cervical Cytology Samples Compared with Clinicopathological Findings and HPV Presence. *Infect Dis Obstet Gynecol* **2011**: 927861.
- Srigley, J.R. & Delahunt, B. (2009): Uncommon and recently described renal carcinomas. *Mod Pathol* **22 Suppl 2**: S2-S23.
- Steiner, G. & Sidransky, D. (1996): Molecular differential diagnosis of renal carcinoma: from microscopes to microsatellites. *Am J Pathol* **149**: 1791-1795.
- Stephen, J.K., Chitale, D., Narra, V., Chen, K.M., Sawhney, R. & Worsham, M.J. (2011): DNA methylation in thyroid tumorigenesis. *Cancers (Basel)* **3**: 1732-1743.
- Takahashi, M., Teh, B. & Kanayama, H. (2006): Elucidation of the molecular signatures of renal cell carcinoma by gene expression profiling. *J Med Invest* **53**: 9-19.
- Thomas, G.V., Tran, C., Mellinghoff, I.K., Welsbie, D.S., Chan, E., Fueger, B., Czernin, J. & Sawyers, C.L. (2006a): Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med* **12**: 122-127.

- Thomas, R.K., Weir, B. & Meyerson, M. (2006b): Genomic approaches to lung cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 4384s-4391s.
- Tickoo, S.K., Amin, M.B., Linden, M.D., Lee, M.W. & Zarbo, R.J. (1997): Antimitochondrial antibody (113-1) in the differential diagnosis of granular renal cell tumors. *Am J Surg Pathol* **21**: 922-930.
- Tickoo, S.K., Amin, M.B., Linden, M.D. & Zarbo, R.J. (1998): The MIB-1 tumor proliferation index in adult renal epithelial tumors with granular cytoplasm: biologic implications and differential diagnostic potential. *Mod Pathol* **11**: 1115-1121.
- Tommasi, S., Dammann, R., Zhang, Z., Wang, Y., Liu, L., Tsark, W.M., Wilczynski, S.P., Li, J., You, M. & Pfeifer, G.P. (2005): Tumor susceptibility of Rassf1a knockout mice. *Cancer Res* **65**: 92-98.
- Toschi, A., Lee, E., Gadir, N., Ohh, M. & Foster, D. (2008): Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem* **283**: 34495-34499.
- Trebec-Reynolds, D.P., Voronov, I., Heersche, J.N. & Manolson, M.F. (2010): VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF-kappaB induction of HIF-1alpha. *J Cell Biochem* **110**: 343-351.
- Tsunematsu, T., Kudo, Y., Iizuka, S., Ogawa, I., Fujita, T., Kurihara, H., Abiko, Y. & Takata, T. (2009): RUNX3 has an oncogenic role in head and neck cancer. *PLoS One* **4**: e5892.
- Urdea, M.S., Merryweather, J.P., Mullenbach, G.T., Coit, D., Heberlein, U., Valenzuela, P. & Barr, P.J. (1983): Chemical synthesis of a gene for human epidermal growth factor urogastrone and its expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 7461-7465.
- Valladares, A., Hernández, N.G., Gómez, F.S., Curiel-Quezada, E., Madrigal-Bujaidar, E., Vergara, M.D., Martínez, M.S. & Arenas Aranda, D.J. (2006): Genetic expression profiles and chromosomal alterations in sporadic breast cancer in Mexican women. *Cancer Genet Cytogenet* **170**: 147-151.
- van der Weyden, L., Tachibana, K.K., Gonzalez, M.A., Adams, D.J., Ng, B.L., Petty, R., Venkitaraman, A.R., Arends, M.J. & Bradley, A. (2005): The RASSF1A isoform of RASSF1 promotes microtubule stability and suppresses tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **25**: 8356-8367.

- van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., García-Sanz, R., van Krieken, J.H., Droese, J., González, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., González, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M. & Macintyre, E.A. (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* **17**: 2257-2317.
- Velickovic, M., Delahunt, B., McIver, B. & Grebe, S. (2002): Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Mod Pathol* **15**: 479-485.
- Vogiatzi, P., De Falco, G., Claudio, P.P. & Giordano, A. (2006): How does the human RUNX3 gene induce apoptosis in gastric cancer? Latest data, reflections and reactions. *Cancer Biol Ther* **5**: 371-374.
- Vos, M.D., Ellis, C.A., Bell, A., Birrer, M.J. & Clark, G.J. (2000): Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem* **275**: 35669-35672.
- Wang, F.S., Wang, C.J., Chen, Y.J., Chang, P.R., Huang, Y.T., Sun, Y.C., Huang, H.C., Yang, Y.J. & Yang, K.D. (2004): Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts. *J Biol Chem* **279**: 10331-10337.
- Wang, G. & Semenza, G. (1995): Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**: 1230-1237.
- Wang, X., Goode, E.L., Fredericksen, Z.S., Vierkant, R.A., Pankratz, V.S., Liu-Mares, W., Rider, D.N., Vachon, C.M., Cerhan, J.R., Olson, J.E. & Couch, F.J. (2008): Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**: 2101-2108.
- Wang, Y.Y., Liu, R.X., Guo, B., Xiao, Y., Shi, M.J., Pi, M.J., Wen, Q.Y. & Zhang, G.Z. (2011): [Down-regulation of PTEN expression in kidney and its role in development of diabetic nephropathy in rats]. *Sheng Li Xue Bao* **63**: 325-332.
- Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R. & Folkman, J. (1991): Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* **324**: 1-8.
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S., Barton, D., Rizzo, C., Ryseck, R., Lira, S. & Bravo, R. (1995): Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* **80**: 331-340.
- Weinberg, R.A. (2007): *The Biology of Cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, an informa business, New York.

- Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., Shujath, J., Gawlak, S., Eveleigh, D., Rowley, B., Liu, L., Adnane, L., Lynch, M., Auclair, D., Taylor, I., Gedrich, R., Voznesensky, A., Riedl, B., Post, L.E., Bollag, G. & Trail, P.A. (2004): BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* **64**: 7099-7109.
- Willard, H.F., Ginsburg, G.S. (2008): Genomic and Personalized Medicine. 1. vydání. Elsevier, Amsterdam.
- Wu, K., Nie, Y., Guo, C., Chen, Y., Ding, J. & Fan, D. (2009): Molecular basis of therapeutic approaches to gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **24**: 37-41.
- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M., Whang, Y. & Sawyers, C. (1998): The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15587-15591.
- Yagoda, A., Abi-Rached, B. & Petrylak, D. (1995): Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol* **22**: 42-60.
- Yanada, M., Yaoi, T., Shimada, J., Sakakura, C., Nishimura, M., Ito, K., Terauchi, K., Nishiyama, K., Itoh, K. & Fushiki, S. (2005): Frequent hemizygous deletion at 1p36 and hypermethylation downregulate RUNX3 expression in human lung cancer cell lines. *Oncol Rep* **14**: 817-822.
- Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X. & Rosenberg, S.A. (2003): A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* **349**: 427-434.
- Yang, X.J., Zhou, M., Hes, O., Shen, S., Li, R., Lopez, J., Shah, R.B., Yang, Y., Chuang, S.T., Lin, F., Tretiakova, M.M., Kort, E.J. & Teh, B.T. (2008): Tubulocystic carcinoma of the kidney: clinicopathologic and molecular characterization. *Am J Surg Pathol* **32**: 177-187.
- Yu, F., White, S., Zhao, Q. & Lee, F. (2001): HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9630-9635.
- Zeghal Souki, D., Bouchahda, H., Kehila, M. & Mahjoub, S. (2011): [Granulosa cell tumors: a study of 7 cases]. *Tunis Med* **89**: 43-46.
- Zhang, S., Wei, L., Zhang, A., Zhang, L. & Yu, H. (2009): RUNX3 gene methylation in epithelial ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines. *OMICS* **13**: 307-311.

- Zhiyong, C., Wentong, L., Xiaoyang, Y. & Ling, P. (2011): PTEN's regulation of VEGF and VEGFR1 expression and its clinical significance in myeloid leukemia. *Med Oncol*.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M., Simons, J. & Semenza, G. (2000): Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* **60**: 1541-1545.
- Zhou, M., Yang, X.J., Lopez, J.I., Shah, R.B., Hes, O., Shen, S.S., Li, R., Yang, Y., Lin, F., Elson, P., Sercia, L., Magi-Galluzzi, C. & Tubbs, R. (2009): Renal tubulocystic carcinoma is closely related to papillary renal cell carcinoma: implications for pathologic classification. *Am J Surg Pathol* **33**: 1840-1849.
- Zimmermann, M., Zouhair, A., Azria, D. & Ozsahin, M. (2006): The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol* **1**: 11.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A., Ryan, H., Johnson, R., Jefferson, A., Stokoe, D. & Giaccia, A. (2000): Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* **14**: 391-396.