



**Univerzita Karlova v Praze**

**3. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce

**Nové biologické markery u  
lymfoproliferativních onemocnění**

**MUDr. Martin Špaček**

Praha 2012

## **Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.

Školící pracoviště: Oddělení klinické hematologie, 3.  
lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze a FN  
Královské Vinohrady, Praha

Autor: MUDr. Martin Špaček

Školitel: prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.

Školitel konsultant: doc. MUDr. Tomáš Kozák, Ph.D.

Oponenti: MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.  
doc. MUDr. Lukáš Smolej, Ph.D.

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské  
fakulty Univerzity Karlovy v Praze

## Obsah

Souhrn .....	4
Summary .....	5
1. Úvod .....	6
1.1 EBV u Hodgkinova lymfomu .....	6
1.2 Gen <i>TP53</i> u maligních lymfoproliferací .....	8
1.3 ZAP-70 u chronické lymfocytární leukemie .....	8
2. Hypotézy a cíle práce .....	9
3. Materiál a metodika .....	10
3.1 EBV-DNA u HL .....	10
3.2 Polymorfismus R72P genu <i>TP53</i> .....	11
3.3 ZAP-70 .....	11
4. Výsledky .....	12
4.1 Monitorace plazmatické EBV-DNA u pacientů s EBV pozitivním HL .....	12
4.2 Analýza <i>TP53</i> R72P polymorfismu u lymfomů .....	13
4.3 ZAP-70 u chronické lymfocytární leukemie .....	13
5. Diskuse .....	14
6. Závěry .....	16
7. Použitá literatura .....	18
8. Seznam publikací .....	22

## Souhrn

Prognóza pacientů s lymfoidními neopláziemi je extrémně variabilní. Spolehlivé prognostické markery mohou pomoci identifikovat skupiny pacientů, které mohou profitovat z odlišných přístupů.

Virus Epstein-Barr (EBV) je asociován přibližně s jednou třetinou pacientů s Hodgkinovým lymfomem (HL). EBV-DNA je často přítomna v plazmě i plné krvi pacientů s EBV-asociovaným HL. Nicméně význam EBV-DNA monitorování je dosud nejasný. V souboru 165 dospělých pacientů s HL jsme prospektivně monitorovali nálož EBV-DNA. Naše výsledky ukázaly, že hodnocení EBV-DNA v plazmě by mohlo být využito k odhadu prognózy a při sledování pacientů s EBV-pozitivním HL.

Role R72P polymorfismu genu *TP53* byla analyzována v několika studiích u NHL, nikoli však dosud u HL. V naší práci jsme hodnotili roli R72P u 340 pacientů s NHL a 298 pacientů s HL. Naše výsledky ukázaly, že R72P není prognostický faktor u bělošských pacientů s NHL a že nemá vliv na vývoj či prognózu HL.

Ve studii se 73 pacienty s chronickou lymfocytární leukemií jsme stanovovali mutační stav IgVH, mutaci genu *TP53* a expresi CD38 a tyrozinkinázy ZAP-70. Celková konkordance mezi expresí ZAP-70 a mutačním stavem IgVH byla 85%. Validace flow cytometrické analýzy exprese ZAP-70 byla provedena srovnáním s imunohistochemickou detekcí ZAP-70 na histologických preparátech a kvantitativní RT-PCR na úrovni ZAP-70 mRNA, kdy celková shoda byla 86%. Exprese ZAP-70 se ukázala být stabilní v průběhu onemocnění

## Summary

The prognosis of patients with lymphoid neoplasms is extremely variable. Reliable prognostic markers could allow the identification of patient subsets that may benefit from alternate approaches.

Epstein-Barr virus (EBV) is associated with approximately one third of Hodgkin lymphoma (HL) cases. EBV-DNA is often present in the plasma and whole blood of EBV-associated HL patients. However, the significance of EBV-DNA monitoring is debated. In a cohort of 165 adult HL patients EBV-DNA viral load was prospectively monitored. Our results suggest that assessment of plasma EBV-DNA viral load might be of value for estimation of prognosis and follow-up of patients with EBV-positive HL.

The role of the *TP53* gene's R72P polymorphism in NHL has been analyzed in several studies but it has not been studied in HL. We have evaluated the role of R72P in 340 NHL and 298 HL patients. Our results support the evidence that R72P is not a prognostic factor in Caucasian NHL patients, and they indicate its irrelevance for HL development or prognosis.

In a study of 73 patients with chronic lymphocytic leukemia we have assessed IgVH mutational status, presence of mutation in *TP53* gene and expression of CD38 and ZAP-70. Overall concordance between ZAP-70 expression and IgVH was 85%. Validation of the flow cytometry ZAP-70 detection was performed by comparison to the immunohistochemical analysis on histological sections and quantitative RT-PCR on the mRNA level; overall concordance was 86 %. Expression of ZAP-70 showed to be stable over time.

## 1. Úvod

V posledních letech jsme v hematologii svědky nebývalého rozvoje terapeutických možností. S vývojem nových chemoterapeutik či biologické léčby (zejména monoklonálních protilátek) se významně zlepšilo přežití pacientů s některými lymfoproliferativními chorobami.

Přes nesporné terapeutické úspěchy posledních let ale zůstávají významným problémem vedlejší nežádoucí účinky léčby i vysoká finanční náročnost nových léků. Proto v současné medicíně nabývá na důležitosti lepší prognostická stratifikace pacientů, která by umožnila větší individualizaci terapie. Tím by bylo možné v některých případech snížit toxicitu léčby při zachování její dostatečné účinnosti a zároveň potenciálně snížit ekonomickou náročnost léčby.

Zejména v případě ne Hodgkinových lymfomů (NHL), kterých WHO klasifikace [1] uvádí několik desítek podtypů, existuje mnohdy značná heterogenita i v rámci jednotlivých diagnóz. Stejná diagnostická jednotka může mít velmi odlišné projevy, klinický průběh, odpověď na léčbu i biologické pozadí. Z těchto důvodů v posledních letech narůstá potřeba nových prognostických faktorů, které by poskytovaly alespoň částečné vysvětlení této heterogenity a umožnily zvolit správný terapeutický postup u konkrétního pacienta a přesněji určit jeho prognózu.

### 1.1 EBV u Hodgkinova lymfomu

Studie zaměřené na prognostický dopad EBV positivity u Hodgkinova lymfomu (HL) přinesly protichůdné výsledky: některé neprokázaly žádný význam, jiné lepší

prognózu u EBV pozitivních tumorů, jiné naopak prognózu horší [2]. Několik studií popsalo přítomnost EBV-DNA v krvi pacientů s EBV pozitivním HL [3]. Význam měření virových kopií EBV-DNA byl studován u více EBV asociovaných malignit. Elevace EBV-DNA byla popsána jako časný znak rozvoje post-transplantačního lymfoproliferativního onemocnění (PTLD), detekovatelný ještě před klinickými projevy nemoci, umožňují tak časnou intervenci [4]. Jako velmi užitečný nádorový marker byla cirkulující volná EBV-DNA prokázána u nasálního typu NK/T buněčného lymfomu [5]. Rovněž u nasofaryngeálního karcinomu je kvantifikace plazmatické EBV-DNA užitečná v monitorování nemoci a v predikci odpovědi na terapii [6]. Gandhi et al. ukázali, že volná EBV-DNA je před léčbou specificky detekovatelná a kvantifikovatelná v plazmě všech pacientů s EBV pozitivním HL [7]. Oproti tomu pacienti s EBV negativním HL neměli volnou EBV-DNA detekovatelnou. U pacientů s EBV pozitivním HL, kteří odpověděli na chemoterapii, došlo po léčbě k poklesu a vymizení EBV-DNA. V jiné studii, která použila konvenční PCR, detekovali EBV DNA u 91% pacientů s EBV pozitivním HL a rovněž u 23% pacientů s EBV negativním lymfomem [8]. Tato data naznačují, že by monitorování virové nálože EBV-DNA v plazmě pomocí kvantitativní PCR mohlo být užitečné u pacientů s EBV pozitivním HL jako neinvazivní marker aktivity onemocnění, k hodnocení odpovědi na léčbu či k časně detekci relapsu po terapii.

## **1.2 Gen *TP53* u maligních lymfoproliferací**

Výskyt mutací *TP53* u lymfoidních malignit je cca 12% [9], přičemž aberantní funkce *TP53* prakticky vždy silně koreluje s horší prognózou, kratším celkovým přežitím, častějšími transformacemi a rezistencí k chemoterapii [10]. S příchodem nových genomických technologií se začala soustředit pozornost rovněž na polymorfismy *TP53*. Bylo identifikováno přes 200 jednonukleotidových polymorfismů (SNP), nicméně většina z nich nejspíše nemá biologický význam. Nejčastější *TP53* polymorfismus R72P (rs1042522; c.215G>C) způsobuje záměnu argininu za prolin na pozici 72 v doméně proteinu p53, která je důležitá v jeho pro-apoptické aktivitě. Jako rizikový a prognostický faktor byl tento polymorfismus studován u mnoha nádorů, nejsilnější asociace byla nalezena u hepatocelulárního karcinomu [11]. Několik studií s protichůdnými výsledky bylo publikováno také u pacientů s NHL, avšak u nemocných s HL dosud nebyl tento polymorfismus studován [12,13,14,15].

## **1.3 ZAP-70 u chronické lymfocytární leukemie**

ZAP-70 patří do rodiny tyrozin kináz a je jednou z membránových proximálních komponent spojených s časnou buněčnou aktivací u T-lymfocytů a NK-buněk [16]. Hraje tak klíčovou roli ve vývoji T-lymfocytů a v přenosu signálu T-buněčného receptoru, avšak jeho funkce u B-lymfocytů není zcela jasná.

ZAP-70 byl původně u CLL identifikován při hledání markerů, které by nahradily relativně technicky a finančně náročné stanovení mutačního stavu IgVH. V současné době je exprese ZAP-70 považována za silný



a nezávislý prognostický faktor, který nenahrazuje, ale doplňuje stanovení mutačního stavu IgVH. Rassenti et al. nejen prokázali, že ZAP-70 a mutační stav IgVH nezávisle predikují klinický průběh CLL, ale navíc v případě diskordantních nálezů měla exprese ZAP-70 silnější prediktivní hodnotu, než mutační stav IgVH [17]. Nevyjasněno otázkou je stabilita exprese ZAP-70 v průběhu onemocnění. Většina studií se přiklání k tomu, že se exprese může v čase změnit, ale není to jev příliš častý a může být spojen s progresí CLL [18,19].

Průtoková cytometrie představuje v současné době nejčastěji užívanou metodu stanovení exprese ZAP-70. Jejímí výhodami oproti ostatním metodám jsou dobrá dostupnost, rychlost a rutinní využití při diagnóze. Navíc pro ni není třeba separovaných B-lymfocytů a výsledek není ovlivněn mírou kontaminace T-lymfocyty ve vzorku. Hlavní a dosud zásadní nevýhodou představuje absence jednotně užívané, standardizované metodiky, jejíž výsledky by byly vzájemně dobře porovnatelné [20].

## **2. Hypotézy a cíle práce**

Základním cílem našich prací bylo analyzovat vybrané biologické prognostické markery u maligních lymfoproliferativních onemocnění.

V případě naší prospektivní studie u Hodgkinova lymfomu bylo cílem zjistit, zda sériové stanovování EBV-DNA jako neinvazivního biologického markeru může být využito v monitorování aktivity choroby a zda může časně predikovat odpověď na léčbu či její selhání. V dlouhodobějším sledování potom zjistit, zda tento marker může předpovídat relaps onemocnění.

V další práci bylo cílem zjistit, zda častý polymorfismus genu *TP53* (R72P) má význam jako rizikový faktor u nehodgkinských lymfomů i Hodgkinova lymfomu a jestli má vliv na prognózu těchto onemocnění.

Dalším naším cílem bylo zavedení jednoduché, reprodukovatelné a přesnější metody stanovení exprese prognostického ukazatele ZAP-70 pomocí průtokové cytometrie v periferní krvi u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií. Tuto metodu poté validovat pomocí korelace se stanovením ZAP-70 mRNA v periferní krvi u pacientů s CLL pomocí kvantitativní Real-Time PCR a rovněž pomocí imunohistochemické detekce ZAP-70 v bioptických vzorcích lymfatických uzlin a kostní dřeně. Naším záměrem bylo také zjistit stabilitu exprese ZAP-70 v průběhu onemocnění.

### **3. Materiál a metodika**

#### **3.1 EBV-DNA u HL**

Mezi lety 2006 – 2009 bylo do studie zahrnuto 165 konsekutivních dospělých pacientů s HL. Léčba probíhala dle protokolů GHSG (German Hodgkin Study Group) a vzorky byly odebírány před terapií, po 2, 4 a 6 cyklech chemoterapie, 3 měsíce, 1 a 2 roky po ukončení léčby, v následných dispenzárních kontrolách.

Dostupné vzorky od 150 pacientů byly analyzovány pomocí *in situ* hybridizace EBER (EBV-encoded RNA) a imunohistochemicky na přítomnost LMP1 (latent membrane protein 1), dle publikovaných postupů [21].

Virová nálož EBV byla kvantifikována pomocí real-time PCR dle dřívějších publikací [22].

### **3.2 Polymorfismus R72P genu *TP53***

Studie zahrnovala 340 pacientů s NHL a 298 s HL, kteří byli léčeni první linií terapie. Jediným vstupním kritériem byla histologicky potvrzená diagnóza NHL či HL dle WHO klasifikace. Vzorky byly sbírány ve třech hematologických odděleních v Praze v letech 2000 – 2010. Jako kontrolní skupina byli vybráni pacienti bez nádorového onemocnění a dárci krve.

Genotypování *TP53* R72P polymorfismu: exon 4 genu *TP53* byl amplifikován na 363 bp dlouhý fragment a následně analyzován pomocí DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography). Eluční DHPLC profily u heterozygotních vzorků by potvrzeny dvojsměrným sekvenováním na ABI3130 (Applied Biosystems).

### **3.3 ZAP-70**

Do studie bylo zařazeno 73 pacientů splňujících diagnostická kritéria pro CLL dle National Cancer Institute Working Group [23]. Při diagnóze byly odebrány vzorky periferní krve od 32 pacientů (44 %) a celkem od 43 pacientů (59 %) byly vzorky získány před léčbou. Vzorky periferní krve v EDTA byly inkubovány s konjugovanými protilátkami proti CD3-PE, CD16-PE, CD56-PE, CD5-APC, CD19-PerCP-Cy5.5. Poté byl vzorek intracelulárně značen protilátkou proti ZAP-70 Alexa Fluor 488 (klon 1E7.2). Výsledky byly vyjadřovány jako poměr střední intenzity fluorescence (MFI) ZAP-70 na T-lymfocytech / CLL buňkách a vzorek byl označen jako pozitivní, pokud byl poměr < 4 [24]. K imunohistochemické detekci byly použity běžně

zpracované a v parafínu zalité bioptické vzorky lymfatických uzlin a kostní dřeně. Použita monoklonální protilátka proti ZAP-70 (klon 2F3.2). Vzorek byl hodnocen jako ZAP-70 pozitivní, pokud se značilo více než 20 % nádorových buněk. K analýze mRNA ZAP-70 byly B-lymfocyty získány pozitivní selekcí navázáním CD19 protilátky pomocí EasySep kitu. Izolovaná celková RNA byla reverzně transkribována a připravená cDNA byla použita jako templát pro kvantitativní Real-Time PCR. Jako kontrolní vzorky byly použity CD19+ separáty zdravých dárců. Relativní exprese ZAP-70 u CLL pacientů 3x vyšší než relativní exprese ZAP-70 u zdravých dárců byla považována za pozitivní. Mutační stav IgVH byl stanoven jak detailně popsáno [25]. Mutační stav genu *TP53* byl analyzován technikou FASAY [26] a přímého sekvenování kódující sekvence (exon 4 – exon 9).

## 4. Výsledky

### 4.1 Monitorace plazmatické EBV-DNA u pacientů s EBV pozitivním HL

V souboru 165 dospělých pacientů s HL byla v 72% detekována nodulární skleróza, ve 24% smíšená celularita a v 5% se jednalo o jiný subtyp. Celkem 29 (19%) pacientů s HL bylo pomocí EBER a LMP1 hodnoceno jako EBV pozitivních. Při použití kvantitativní RT-PCR mělo před terapií 22 (79%) EBV-pozitivních pacientů s HL detekovatelnou EBV-DNA v plazmě a 19 (66%) v plné krvi. Ve skupině pacientů s EBV-negativním HL byla EBV-DNA v plazmě

detekována před terapií ve 3 (2%) případech a EBV-DNA v plné krvi u 30 (25%) případů. EBV-pozitivní HL byly signifikantně asociovány s EBV-DNA pozitivitou před léčbou v plazmě i v plné krvi, dále s vyšším věkem a se smíšenou celularitou. Sériové měření plazmatické EBV-DNA ukázalo, že odpověď na léčbu byla asociována s poklesem virové nálože. Navíc u jednoho pacienta došlo po ukončení léčby k novému vzestupu plazmatické EBV-DNA, který předcházel klinickému relapsu HL.

#### **4.2 Analýza *TP53* R72P polymorfismu u lymfomů**

Celkem u 340 pacientů s NHL a 298 pacientů s HL jsme vyhodnotili roli polymorfismu R72P genu *TP53*. Neprokázali jsme žádný rozdíl ve výskytu R72P mezi analyzovanými lymfomy a 749 kontrolními případy. Nebyla zjištěna žádná asociace mezi R72P a rizikem rozvoje NHL či HL [ORArgPro/ProPro = 0.9 (95% CI 0.7–1.2) and 1.2 (95% CI 0.9–1.5)], nebo s přežitím. Naše výsledky prokázaly, že polymorfismus R72P není prognostickým faktorem u pacientů s NHL a že nemá vliv na rozvoj HL či prognózu pacientů s HL.

#### **4.3 ZAP-70 u chronické lymfocytární leukemie**

Celkem u 73 pacientů jsme stanovili mutační stav variabilních segmentů genů pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgVH), mutaci genu *TP53* a pomocí flow-cytometrie (FCM) expresi CD38 a tyrozinkinázy ZAP-70. Nemutovaný stav IgVH mělo 58 % nemocných, mutaci *TP53* 19 %, pozitivní expresi CD38 26 % a pozitivní expresi ZAP-70 dle FCM 62 %. Pacienti s nemutovaným IgVH, pozitivní expresí ZAP-70 dle

FCM a mutací *TP53*, měli statisticky významně kratší čas od diagnózy do zahájení terapie. Celková konkordance mezi expresí ZAP-70 a mutačním stavem IgVH byla 85 %. Validace FCM analýzy exprese ZAP-70 byla provedena srovnáním s imunohistochemickou detekcí ZAP-70 na histologických preparátech a kvantitativní Real-Time PCR na úrovni ZAP-70 mRNA, kdy celková shoda byla 86 %. Exprese ZAP-70 se ukázala být stabilní v průběhu onemocnění; při mediánu 12 měsíců mezi odběrem prvního a posledního vzorku byla zaznamenána kvalitativní změna exprese ZAP-70 pouze u jednoho pacienta, kdy se stala pozitivní při progresi onemocnění.

## 5. Diskuse

Zastoupení EBV-pozitivních případů HL v našem souboru bylo nižší (19%) než ve většině studií na Západě (30-50%) [27], což lze pravděpodobně vysvětlit vyšším zastoupením podtypu nodulární sklerózy.

Gandhi et al. ukázali, že EBV-DNA je před léčbou specificky detekovatelná v plazmě EBV-pozitivních pacientů s HL [7]. V naší kohortě 29 EBV-pozitivních a 121 EBV-negativních pacientů s HL plazmatická EBV-DNA signifikantně, ačkoli ne specificky, korelovala s EBV stavem HL: EBV-DNA byla před léčbou detekovatelná u 76% vzorků EBV-pozitivních HL a 2% EBV-negativních HL. Sériová analýza vzorků provedená u všech pacientů ukázala, že EBV-DNA v plazmě i plné krvi signifikantně klesá po chemoterapii. Nicméně proporce EBV-DNA pozitivních vzorků v plné krvi zůstává relativně vysoká i během úspěšné terapie (až

28%), a proto nemůže být monitorování EBV-DNA v plné krvi doporučeno jako vhodný marker odpovědi na léčbu. Na druhou stranu volná plazmatická EBV-DNA pravděpodobně představuje virovou DNA uvolněnou přímo z nádorových HRS buněk a může proto odpovídat aktivitě choroby [3]. V našem souboru pouze 3 pacienti měli detekovatelnou EBV-DNA v plazmě již po 2 cyklech chemoterapie, z nichž 2 dosáhli parciální remise a 1 kompletní remise.

První studie hodnotící *TP53* R72P polymorfismus u NHL pacientů ukázala hraniční asociaci se zvýšeným rizikem NHL u 103 japonských pacientů [28]. Nicméně jiná studie zahrnující 311 pacientů s NHL ve střední Evropě vyšší riziko vzniku NHL neprokázala [29]. Podobné výsledky přinesly i další studie ze Západních zemí [30,31]. Nelze vyloučit, že R72P je asociováno s vyšším rizikem NHL pouze u asijských pacientů. To podporují studie, které prokázaly rozdílnou asociaci R72P polymorfismu např. u hepatocelulárního karcinomu v závislosti na daném etniku [32].

Oproti NHL, nebyla u pacientů s HL dosud analýza polymorfismu R72P provedena. Naše výsledky založené na analýze 298 případů HL ukázaly jako nepravděpodobné, že by tento polymorfismus *TP53* genu modifikoval riziko vzniku HL a prognózu pacientů.

Mezi hlavní limitace stanovování prognostického faktoru u CLL tyrozinkinázy ZAP-70 je chybějící standardizovaný a jednotný protokol FCM měření, které je v praxi nejvíce používanou metodou. Jako zásadní se jeví volba strategie gatingu, pozitivní a negativní

kontroly a určení hranice pro pozitivitu [33]. Ačkoli byla již publikována celá řada prací s cílem optimalizovat metodu FCM analýzy a ujednotit postup i na mezinárodní úrovni, nezdá se ani v budoucnosti jako reálné implementování jednotné metody ZAP-70 FCM stanovení v jednotlivých cytometrických laboratořích. Z tohoto důvodu jsme v naší studii pomocí referenční metody kvantitativní RT-PCR i imunohistochemie ověřili vysokou validitu námi použité FCM analýzy, převzaté ze dvou velkých mezilaboratorních harmonizačních studií [34,35]. Diskutovanou otázkou zůstává stabilita ZAP-70 exprese v průběhu onemocnění. Některé publikace poukázaly na nezanedbatelné procento pacientů se změnou exprese ZAP-70 (29,30). V naší skupině pacientů byla při zvolené FCM metodě exprese ZAP-70 relativně stálá, a to i po podané léčbě, přičemž jsme zaznamenali pouze v jednom případě kvalitativní změnu (počáteční negativita v pozitivitu), a to jednoznačně v souvislosti s progresí onemocnění.

## **6. Závěry**

V prospektivní studii jsme u 165 pacientů s Hodgkinovým lymfomem stanovovali plazmatickou EBV-DNA. Většina pacientů (76%) s EBV pozitivním HL měla před zahájením terapie detekovatelnou EBV-DNA v plazmě. Následné sériové měření ve vzorcích odebraných během terapie a po ní ukázalo, že odpověď na léčbu byla asociovaná s poklesem až vymizením detekovatelné virové nálože EBV-DNA. U jednoho pacienta se navíc objevil signifikantní nový vzestup EBV-DNA po dokončení terapie, který byl posléze



následován klinickým relapsem onemocnění. Naše výsledky ukázaly, že měření EBV-DNA v plazmě může mít význam k upřesnění prognózy u pacientů s EBV pozitivním HL, že vymizení plazmatické EBV-DNA během terapie koreluje s dobrou odpovědí na léčbu a naznačily, že by tento marker mohl časně upozornit na relaps onemocnění.

V další práci jsme analýzou častého polymorfismu genu *TP53* R72P u pacientů s Hodgkinovým lymfomem i nehodgkinskými lymfomy prokázali, že polymorfismus R72P nemá význam jako rizikový faktor pro vznik lymfomu, ani nemá vliv na přežití těchto pacientů.

U nemocných s chronickou lymfocytární leukemií jsme v periferní krvi stanovovali expresi ZAP-70 na CLL buňkách pomocí zvolené flow-cytometrické metody. Srovnáním s paralelním měřením ZAP-70 pomocí PCR a imunohistochemické detekce jsme prokázali vysokou korelaci mezi těmito metodami a potvrdili tak validitu zvoleného měření průtokovou cytometrií. Navíc jsme prokázali značnou stabilitu exprese ZAP-70 v průběhu onemocnění.

## 7. Použitá literatura

1. Swerlow SH, Campo E, Harris NL et al. (Eds.), *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, IARC, Lyon 2008
2. Ambinder RF, Lawrence MW. „Association of Epstein-Barr Virus with Hodgkin Lymphoma“, in *Hodgkin Lymphoma*, Hoppe RT, Mauch PM, Armitage JO et al. (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
3. Musacchio JG, Carvelho Mda G, Morais JS, et al. *Detection of free circulating Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with Hodgkin's disease*. Sao Paulo Med J 2006;124(3):154-157.
4. Rooney CM, Loftin SK, Holladay MS, et al. *Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease*. Br J Haematol 1995;89:98-103.
5. Au WY, Pang A, Choy C, et al. *Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients*. Blood 2004;104:243-249.
6. Lin JC, Wang WY, Chen KY, et al. *Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma*. N Engl J Med 2004 Jun 10;350(24):2461-70.
7. Gandhi MK, Lambley E, Burrows J, et al. *Plasma Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Is a Biomarker for EBV-Positive Hodgkin's Lymphoma*. Clin Cancer Res 2006;12(2):460-464.
8. Gallagher A, Armstrong AA, Mackenzie J, et al. *Detection of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in the serum of patients with EBV-associated Hodgkin's disease*. Int J Cancer 1999;84(4):442-448.
9. Newcomb EW. *P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance*. Leuk Lymphoma 1995;17(3-4):211-21.

10. Cheung KJ, Horsman DE, Gascoyne RD. *The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target.* Br J Haematol 2009;146(3):257-69.
11. Francisco G, Menezes PR, Eluf-Neto J, Chammas R. *Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies.* Int J Cancer 2011;15;129(4):920-30.
12. Hishida A, Matsuo K, Tajima K, et al. *Polymorphisms of p53 Arg72Pro, p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p21 Ser31Arg and the risk of non-Hodgkin's lymphoma in Japanese.* Leuk Lymphoma 2004;45:957-964.
13. Kim HN, Yu L, Kim NY, et al. *Association with TP53 codon 72 polymorphism and the risk of non-Hodgkin lymphoma.* Am J Hematol 2010;85:822-824
14. Bittenbring J, Parisot F, Wabo A, et al. *MDM2 gene SNP309 T/G and p53 gene SNP72 G/C do not influence diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma onset or survival in central European Caucasians.* BMC Cancer 2008;8:116.
15. Wrench D, Waters R, Carlotti E, et al. *Clinical relevance of MDM2 SNP 309 and TP53 Arg72Pro in follicular lymphoma.* Haematologica 2009;94:148-150.
16. Mustelin T, Tasken K. *Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases.* Biochem J 2003;371:15-27.
17. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. *ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia.* N Engl J Med 2004;351:893-901.
18. Poulain S, Benard C, Daudignon A, et al. *Is ZAP-70 expression stable over time in B chronic lymphocytic leukaemia?* Leuk Lymphoma 2007;48(6):1219-21.

19. Gibbs G, Bromidge T, Howe D, Johnson S, et al. *ZAP-70 expression remains stable in chronic lymphocytic leukaemia*. Int Jnl Lab Hem 2007; 29: 225–227.
20. Smolej L, Saudková L, Špaček M, Kozák T. *ZAP-70 u chronické B-lymfocytární leukémie: klinický význam a metody detekce*. Vnitr Lek. 2006;52(12):1194-9.
21. Gulley ML, Glaser SL, Craig FE et al. *Guidelines for Interpreting EBER In Situ Hybridization and LMP1 Immunohistochemical Tests for Detecting Epstein-Barr Virus in Hodgkin Lymphoma*. Am J Clin Pathol 2002;117:259-267
22. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. *Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay*. J Clin Microbiol 1999; 37:132-136.
23. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. *National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment*. Blood 1996;87(12):4990-7
24. Letestu R, Rawstron A, Ghia P, et al. *Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process*. Cytometry B Clin Cytom 2006;70(4):309-14.
25. Peková S, Marková J, Pajer P et al. *Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Mol Diagn 2005;9(1):23-34.
26. Smardova J, Ksicova K, Binkova H, et al. *Analysis of tumor suppressor p53 status in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncol Rep. 2004 Apr;11(4):923-9.
27. Weinreb M, Day PJ, Niggli F, et al. *The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographical areas*. Arch Dis Child 1996;74:27-31.
28. Hishida A, Matsuo K, Tajima K, et al. *Polymorphisms of p53 Arg72Pro, p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p21 Ser31Arg*

- and the risk of non-Hodgkin's lymphoma in Japanese. Leuk Lymphoma* 2004;45:957-964.
29. Bittenbring J, Parisot F, Wabo A, et al. *MDM2 gene SNP309 T/G and p53 gene SNP72 G/C do not influence diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma onset or survival in central European Caucasians. BMC Cancer* 2008;8:116.
  30. Hill DA, Wang SS, Cerhan JR, et al. *Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes. Blood* 2006;108:3161-3167.
  31. Wrench D, Waters R, Carlotti E, et al. *Clinical relevance of MDM2 SNP 309 and TP53 Arg72Pro in follicular lymphoma. Haematologica* 2009;94:148-150.
  32. Francisco G, Menezes PR, Eluf-Neto J, Chammas R. *Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: A comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies. Int J Cancer* 2011;129(4):920-30.
  33. Smolej L, Saudková L, Špaček M, Kozák T. *ZAP-70 u chronické B-lymfocytární leukemie: klinický význam a metody detekce. Vnitř Lék* 2006;52(12):1194-9.
  34. Letestu R, Rawstron A, Ghia P, et al. *Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process. Cytometry B Clin Cytom* 2006;70(4):309-14.
  35. Le Garff-Tavernier M, Ticchioni M, Brissard M, et al. *National standardization of ZAP-70 determination by flow cytometry: the French experience. Clin Cytom* 2007;72(2):103-8.

## 8. Seznam publikací

### 1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

#### a) s IF

**Špaček M**, Hubáček P, Marková J, Zajac M, Vernerová Z, Kamaradová K, Stuchlý J, Kozák T. *Plasma EBV-DNA monitoring in Epstein-Barr virus positive Hodgkin lymphoma patients*. APMIS 2011;119(1):10-16. [IF 2010 1.944]

**Špaček M**, Hubáček P, Marková J, Zajac M, Vernerová Z, Kozák T. *Can we use EBV-DNA monitoring to predict disease relapse in EBV-positive Hodgkin lymphoma patients?* Acta Haematol. 2010;124(1):23-6. [IF 2010 1.316]

Havránek O, **Špaček M**, Hubáček P, Móciková H, Benešová K, Souček P, Trněný M, Kleibl Z. *No association between the TP53 codon 72 polymorphism and risk or prognosis of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma*. Leuk Res. 2011;35(8):1117-9. [IF 2010 2.555]

#### b) bez IF

**Špaček M**, Peková S, Bezdíčková L, Kozák T. *Rizikové faktory u chronické lymfocytární leukemie, validace flow-cytometrické detekce ZAP-70 pomocí RT-PCR a imunohistochemie*. Transfuzie Hematol. dnes 2009;15(2): 91-96.

## 2. publikace *in extenso* se vztahem k tématu dizertace

### a) s IF

Havránek O, Špaček M, Hubáček P, Móciková H, Marková J, Trněný M, Kleibl Z. *Alterations of CHEK2 forkhead-associated domain increase the risk of Hodgkin lymphoma*. *Neoplasma*. 2011;58(5):392-5. [IF 2010 1.449]

Peková S, Čmejla R, Smolej L, Kozák T, Špaček M, Prucha M, *Identification of a novel, transactivation-defective splicing variant of p53 gene in patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Res* 2008;32(3):395-400. [IF 2008 2.390]

### b) bez IF

Smolej L., Saudková L., Špaček M, Kozák T. *ZAP-70 u chronické B-lymfocytární leukémie: klinický význam a metody detekce*. *Vnitřní lékařství* 2006;52(12):1194-1199.

Bezdíčková L, Špaček M, Peková S, Kozák T, *Minimální reziduální nemoc u chronické lymfocytární leukémie: metody stanovení a klinický význam*. *Transfúze Hematol. dnes* 2008;14(3):124-130.

### 3. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

#### a) s IF

Sedláčková L, **Špaček M**, Holler E, Imryšková Z, Hromadníková I. *Heat-shock protein expression in leukemia*. Tumor Biol 2011;32(1):33-44. [IF 2010 2.026]

Lysák D, Kalina T, Martínek J, Pikalová Z, Vokurková D, Jarešová M, Marinov I, Ondřejková A, **Špaček M**, Stehlíková O. *Interlaboratory variability of CD34+ stem cell enumeration. A pilot study to national external quality assessment within the Czech Republic*. Int J Lab Hematol 2010;32(6 Pt 1):e229-36 [IF 2010 1.368]

Hromadníková I, Volchenkov R, Sedláčková L, **Špaček M**, Kozák T. *Expression of heat shock protein 70 and NKG2D ligands in acute myeloid leukemia cell lines*. J Recept Signal Transduct 2010;30(3):161-9. [IF 2010 1.822]

Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al, on behalf of the European Myeloma Network. *Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders*. Haematologica 2008 Mar; 93(3):431-438. [IF 2008 5.978]

Kahle M, Přidalová J, **Špaček M**, Dzijak R, Hozák P, *Nuclear myosin is ubiquitously expressed and evolutionary conserved in vertebrates*. Histochem Cell Biol 2007 Feb; 127(2):139-48. [IF 2007 2.893]



**b) bez IF**

Smolej L, Procházka V, **Špaček M**, et al. *Doporučení pro léčbu alemtuzumabem u chronické lymfocytární leukemie (CLL)*. Vnitr Lek 2012 Mar;58(3):232-6.

Fauknerová M, Osmančík P, **Špaček M**, Kejst L, Kalvach P. *Agregometrie v sekundární prevenci cévních mozkových příhod. Aspirinová rezistence*. Česk Slov Neurol N 2011; 74/107(5):527-532.

Fialová L, **Špaček M**, Vychytil P, *Střet zájmů v medicíně: stanovisko Světové lékařské asociace*. Cas Lek Cesk. 2011;150(10):554-557.