

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Molekulární charakteristika vybraných vzácných nádorových
onemocnění**

Bakalářská práce

Jan Vondrák

Školitelka: prof. MUDr. Alena Skálová, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Tomáš Vaněček, Ph.D.

České Budějovice 2021

Vondrák J., 2021: Molekulární charakteristika vybraných vzácných nádorových onemocnění [Molecular characteristic of chosen rare tumors. BC. Thesis, in Czech] – p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Salivary glands tumors are a rare group of cancer disease. Individual tumor units are usually characterized by few molecular aberrations, especially fusion transcripts. In my thesis, I have analyzed and defined 135 cases of selected salivary gland tumors and their specific fusion transcripts using next generation sequencing (NGS) and fluorescence *in-situ* hybridization (FISH). The specific fusion transcripts were found in 109 cases (80,5 %). Beside canonical fusion markers of salivary gland tumors fusions, I have found 3 novel fusion transcripts. In two pleomorphic adenomas, fusion transcripts *MALAT1-PLAG1* and *HMGA2-FLJ41278* were found and another *FUS-PPARG* fusion transcript was depicted in oncocytoma. These fusions broaden the spectrum of aberrations that will help us to carry out more accurate classification of tumors and, eventually, better prognosis or prediction of these diseases.

Prohlašuji, že jsem autorem bakalářské práce Molekulární charakteristika vybraných vzácných nádorových onemocnění a vypracovala jsem ji samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích, 7.12.2021

.....

Jan Vondrák

Poděkování

Rád bych poděkoval mé školitelce prof. MUDr. Aleně Skálové, CSc. za skvělé vedení mé bakalářské práce po teoretické stránce a spoluškolitelovi RNDr. Tomáši Vaněčkovi, Ph.D. za skvělé vedení mé práce po praktické stránce a také doc. Mgr. Tomášovi Doležalovi, Ph.D., za to že mi umožnil zpracovat bakalářskou práci v externím pracovišti.

Dále bych chtěl poděkovat kolektivu Biopstické laboratoře s.r.o. za vstřícnost a umožnění vypracování mé práce. Zejména bych chtěl poděkovat RNDr. Petru Grossmannovi, Ph.D., RNDr. Radkovi Šimovi Ph.D., RNDr. Petru Martínkovi Ph.D. za jejich ochotu s čímkoliv pomoci.

Na závěr bych rád poděkoval své rodině za trpělivost a podporu.

Seznam použitých zkratek

3'UTR	<i>3' untranslated region</i> (3' netranslatovaná oblast)
AcicCC	<i>acinic cell carcinoma</i> (acinický karcinom)
AdCC	<i>adenoid cystic carcinoma</i> (adenoidně cystický karcinom)
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
BTB/POZ	<i>bric-abrac tramtrack Broad complex/poxvirus and zinc finger</i>
CCB	<i>core-cut</i> biopsie
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementární DNA)
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CT	<i>computer tomography</i> (počítačová tomografie)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
ddNTP	dideoxynukleotid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (deoxyribonukleová kyselina)
dNTP	deoxynukleotid
FFPE	<i>formalin fixed paraffin embeded</i> (formalinem fixované a v parafinu zalité)
FISH	<i>fluorescence in-situ hybridization</i> (fluoresceční <i>in-situ</i> hybridizace)
FNA	<i>fine needle aspiration</i> (tenkojehlová biopsie)
FTC	<i>follicular thyroid carcinoma</i> (folikulární karcinom štítné žlázy)
GCO	<i>Global Cancer Observatory</i>
GIP	glukóza-dependentní insulinotropní polypeptid
HCl	kyselina chlorovodíková
HE	hematoxilin-eosin
IC	<i>intraductal carcinoma</i> (intraduktální karcinom)
MASC	<i>mammary analogue secretory carcinoma</i> (mamární analog sekrečního karcinomu)

MEC	<i>mucoepidermoid carcinoma</i> (mukoepidermoidní karcinom)
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MRI	magnetická rezonance
NGS	<i>next generation sequencing</i> (sekvenování druhé generace)
NK	nukleová kyselina
PA	<i>pleomorphic adenoma</i> (pleomorfní adenom)
PAC	<i>polymorphic adenocarcinoma</i> (polymorfní adenokarcinom)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (polymerázová řetězová reakce)
PT	pokožková teplota
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> (kvantitativní polymerázová řetězová reakce)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ribonukleová kyselina)
RT	<i>reverse transcription</i> (reverzní transkripce)
RTK	receptor tyrosin kináza
SC	<i>secretory carcinoma</i> (sekreční karcinom)
SD	<i>standard deviation</i> (směrodatná odchylka)
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate buffer</i> (citrátový pufr)
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
USG	ultrasonografické vyšetření
WHO	<i>World Health Organization</i> (Světová zdravotnická organizace)

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Nádory slinných žláz.....	2
2.1. Incidence a hlavní klinické charakteristiky nádorů slinných žláz.....	2
2.2. Diagnostika nádorů slinných žláz.....	4
2.3. Morfologická klasifikace nádorů slinných žláz.....	5
2.4. Diferenciálně diagnosticky a prognosticky významné molekulární alterace v nádorech slinných žláz.....	6
3. Hlavní molekulární metody využívané v diagnostice nádorů.....	8
3.1 Fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace.....	8
3.2 Izolace RNA, DNA.....	9
3.3. Reverzní transkripce.....	9
3.4. Sekvenování nové generace.....	9
4. Cíle práce.....	12
5 Materiál a metody.....	13
5.1 Izolace DNA a RNA z fixovaného materiálu kitem Maxwell RSC DNA FFPE Kit.....	13
5.1.1 Postup izolace.....	14
5.1.2 Měření koncentrace NK.....	15
5.2 Fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace (FISH).....	15
5.2.1 Příprava roztoků.....	15
5.2.2 Proces postupu metody FISH.....	16
5.4 Sekvenování druhé generace (NGS).....	20
5.4.1 Postup přípravy vzorku na NGS.....	20
5.4.2 Sekvenování NGS vzorků (NextSeq 500) a analýza získaných dat.....	26
6. Výsledky.....	27
7. Diskuze.....	35
8. Závěry.....	41
Seznam použité literatury.....	42

1. Úvod

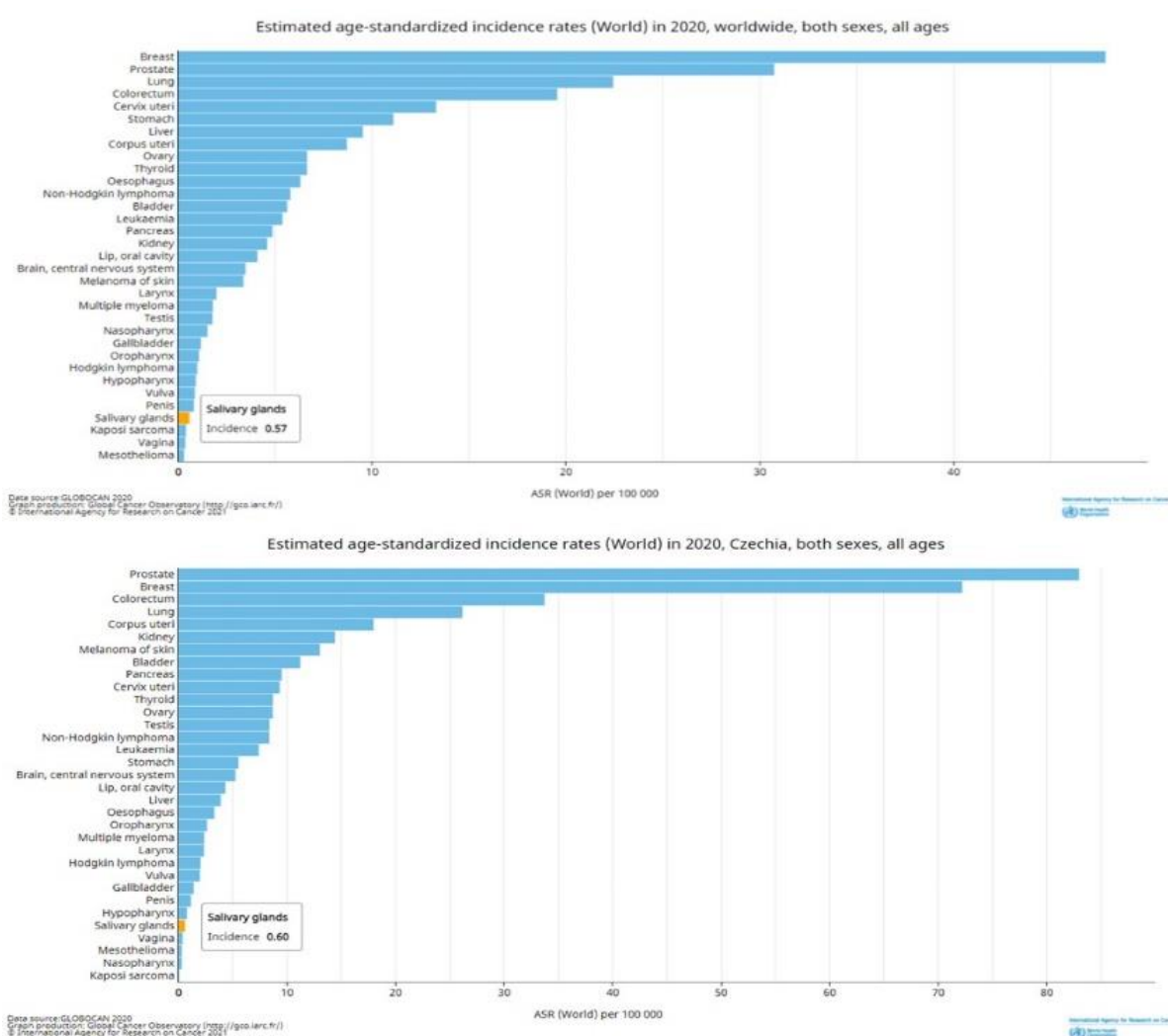
Nádor je tkáňová masa, která vzniká v důsledku excesivní, nekoordinované a autonomní proliferace transformovaných buněk (1). Nádory vznikají monoklonální proliferací nádorové buňky, jejíž genetická alterace se přenáší do dalších dceřiných buněk nádorové populace. Nádory (neoplázie) rozdělujeme na nádory benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní nádory rostou expanzivně, neinfiltrují destruktivně okolní zdravou tkáň, zpravidla nezakládají metastázy a nejsou schopny neomezeného růstu. Naproti tomu, maligní nádory rostou ve tkáni invazivně a destruktivně, mají nekontrolovatelný růst do okolních tkání a zpravidla jsou schopny založit metastázy. Schopnost metastazování, tj. zakládání sekundárních nádorových ložisek v místech vzdálených od primárního nádoru, je hlavní znak malignity, ale zdaleka ne všechny maligní nádory nutně musí metastazovat.

Benigní nádory bývají na genetické úrovni méně komplexní – mají menší počet mutací než maligní nádory a jsou relativně geneticky stabilní a mají menší tendenci k akumulaci dodatečných mutací v čase. Genetická instabilita naopak charakterizuje maligní nádory. Maligní nádory jsou geneticky velmi komplexní, během mnohastupňového procesu kancerogeneze dochází k akumulaci mnohočetných mutací, jejichž počet, pořadí vzniku alterací a zasažení konkrétních genů v rámci získávání maligního fenotypu je pro každý maligní nádor individuální (1).

2. Nádory slinných žláz

2.1. Incidence a hlavní klinické charakteristiky nádorů slinných žláz

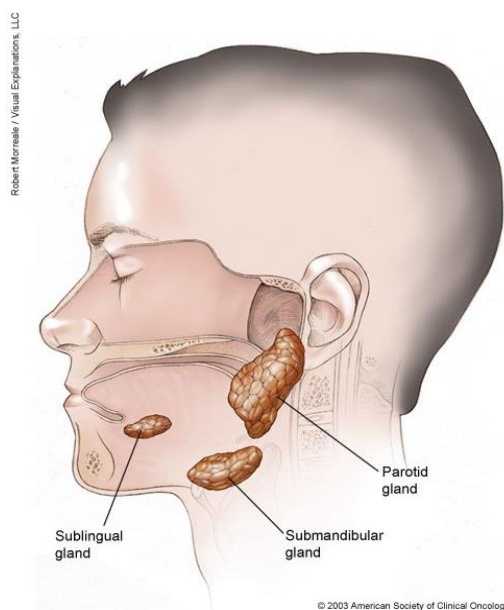
V roce 2020 bylo podle statistik *Global Cancer Observatory* (GCO) diagnostikováno 19 292 789 nových případů zhoubných nádorů všech lokalizací, z toho bylo 53 583 nádorů slinných žláz, což představuje 0,28 % z celkového počtu (**Obrázek 1A-B**) (2). V České republice bylo dle GCO v roce 2020 nově diagnostikováno 67 003 případů maligních nádorů všech lokalizací, na salivární malignity pak připadlo celkem 139 nových případů (0,21 %) (2).



Obrázek 1 A-B: Porovnání incidence nádorových onemocnění u mužů a žen celosvětově (Obr. 1A) a v České republice (Obr. 1B) ve vztahu k nádorům slinných žláz, za rok 2020. (Zdroj: Global Cancer Observatory) (1)

Nádory slinných žláz jsou vzácné, karcinomy slinných žláz představují celkově méně než 0,5 % malignit a na žebříčku incidence jim patří 30. místo celosvětově a to u obou pohlaví. Podobně vzácné jsou nádory slinných žláz ve statistikách České republiky, kde se nacházejí na 29. místě, a to jak u mužů, tak u žen (**Obrázek 1**) (2).

Většina nádorů vychází z velkých slinných žláz; až 80 % vzniká v příušní žláze, 15 % v podčelistní žláze a zbylých 5 % v podjazykové a v malých slinných žlázách, které jsou rozptýleny v dutině ústní a horním aerodigestivním traktu (**Obrázek 2**) (3). Až v 75 % případů se jedná o nádory benigní. Se snižující se velikostí žlázy, se zvyšuje riziko vzniku malignity, které tedy s velikostí žlázy obráceně koreluje. Zatímco u nádorů vznikajících z malých slinných žláz a ze sublinguální žlázy je riziko malignity až 50-81 %, u submandibulární žlázy je to 40-50 % a u nádorů vycházejících z příušní žlázy je riziko malignity méně než 25 % (4).



Obrázek 2: Topografická anatomie velkých slinných žláz. (<https://www.cancer.net/cancer-types/salivary-gland-cancer/medical-illustrations>)

Primární nádory slinných žláz jsou většinou epiteliálního původu, méně často se vyskytují nádory mesenchymální a hematologické (5). Z mesenchymálních nádorů se ve slinných žlázách vyskytují zejména benigní hemangiom, lipom, neurofibrom a schwannom. Sarkomy a jiné maligní měkkotkáňové tumory jsou vzácné a je nutné je odlišit od jiných sarkomatoidně vyhlížejících malignit. Z hematologických malignit se parotis nejčastěji vyskytuje extranodální lymfom z B-buněk marginální zóny, tzv. MALT lymfom, který vzniká především v terénu Sjögrenova syndromu (6). Ve skupině salivárních nádorů

epiteliálního původu je dle WHO 2017 (5) nejčastějším zhoubným novotvarem velkých i malých slinných žláz mukoepidermoidní karcinom, který představuje 30-35 % všech malignit slinných žláz. Na dalších pozicích je z hlediska výskytu zhoubných novotvarů slinných žláz adenoidně cystický karcinom (20 %), karcinom ex pleomorfní adenom (10-15 %), polymorfní adenokarcinom (10-15 %), sekreční karcinom a acinický karcinom (10 %). Nejčastější benigní epiteliální nádory slinných žláz jsou pleomorfní adenom a Warthinův nádor příušní žlázy. Metastatické sekundární nádory slinných žláz představují zhruba 5 %. Naprostá většina metastáz je lokalizována v příušní žláze a až v 80 % je primární nádor nalezen v oblasti hlavy a krku. Opačně je tomu v případě submandibulární žlázy, kde až 85 % metastáz pochází odjinud než z oblasti hlavy a krku a prognosticky jsou závažnější než metastázy parotické. Do slinných žláz však může metastazovat prakticky každý nádor tvořící vzdálené metastázy. Nejčastěji jsou přítomny metastázy dlaždicobuněčných karcinomů kůže a z oblasti horního aerodigestivního traktu (7).

Klinické příznaky nádorů slinných žláz jsou rozdílné podle lokalizace a povahy tumoru. Nachází-li se nádor ve velkých slinných žlázách, projevují se jak benigní, tak maligní nádory nejčastěji nebolestivou hmatnou rezistencí, eventuálně i viditelným jednostranným zduřením v oblasti postižené žlázy. Benigní nádory se takto mohou projevovat i několik let a pacientovi prakticky nečiní větších obtíží až do doby, než expanzivně rostoucí nádor přeroste do rozměrů, kdy utlačuje okolní struktury a může se rozvinout bolest. Objeví-li se paréza lícního nervu periferního typu, je to téměř vždy známkou zhoubného nádoru, který se perineurálně propaguje, což může způsobovat bolest.

2.2. Diagnostika nádorů slinných žláz

Přestože jsou nádory slinných žláz vzácné, představují velmi problematickou skupinu nádorových jednotek. Jedná se o velmi heterogenní skupinu onemocnění se značně variabilním histologickým nálezem. Histomorfologické a imunohistochemické znaky se totiž v četných nádorových jednotkách vzájemně překrývají, což komplikuje jejich diagnostiku. Nádory slinných žláz jsou charakteristické především svou morfologickou variabilitou, která se může projevovat i v rámci jednoho tumoru, kdy se různá místa novotvaru strukturálně liší, což znesnadňuje diagnostiku především z probatorních excizií.

Základem předoperační diagnostiky jsou anamnéza, klinické vyšetření a zobrazovací metody. Ultrasonografické vyšetření (USG) je vzhledem ke své dostupnosti nejvyužívanější

zobrazovací metodou v diagnostice nádorů slinných žláz. USG vyšetření má vysokou senzitivitu, avšak nízkou specificitu pro diagnostiku konkrétního typu nádoru. Sonografická kontrola je dále hojně využívána při odběru diagnostického materiálu k cytologickému (*fine needle aspiration* - FNA), eventuálně bioptickému vyšetření metodou „*core-cut*“ biopsie (CCB). K sofistikovanějším zobrazovacím metodám, jako je počítačová tomografie (CT), nebo magnetické rezonance (MRI) se přistupuje ve vybraných případech, kdy není jasný rozsah tumoru či vztah k okolním strukturám. Obě metody jsou vhodné k určení lokální pokročilosti a zhodnocení přítomnosti regionálních i vzdálených metastáz.

Nedílnou součástí předoperační diagnostiky je cytologické vyšetření. Jedná se o vyšetření prováděné metodou tzv. tenkojehlové aspirační cytologie (FNA). Principem FNA je proniknutí jehly celou tloušťkou tumoru a nasátí dostačujícího množství nádorových buněk do stříkačky a jejich následné zpracování k cytologickému vyšetření. Vedle FNA lze v rámci předoperačního vyšetření nádorů slinných žláz využít též metodu *core-cut* biopsie, kterou je možno získat dostatečný materiál pro histologické, imunohistochemické či genetické vyšetření. Tato metoda je sice diagnosticky výtěžnější, ale ve srovnání s FNA je větší riziko komplikací spojených s odběrem (8). Mezi tyto komplikace patří především riziko poranění lícního nervu, implementace maligních nádorových buněk podél punkčního kanálu, riziko zanesení infekce, eventuálně iatrogeně indukovaná nekróza nádoru (9). Další metodou pro získání tkáně k bioptickému vyšetření je probatorní excize, která je z hlediska množství tkáně ještě přínosnější než CCB biopsie.

Finální diagnóza se pooperačně stanovuje histologickým vyšetřením excize nádorového ložiska či resektátu žlázy. K vyšetření se využívá rutinního barvení hematoxilinem-eosinem (HE), metod imunohistochemických, a v poslední době také metod molekulárně biologických.

2.3. Morfologická klasifikace nádorů slinných žláz

Nádory slinných žláz se klasifikují podle WHO Klasifikace Nádorů hlavy a krku z roku 2017 (10) a obecně se dělí na benigní a maligní. Správná klasifikace je mandatorní zejména u nádorů maligních, karcinomů, protože správné určení histologického typu nádoru do značné míry definuje biologické chování, riziko recidivy, prognózu a tím též určuje optimální klinický management pacienta (11). Některé karcinomy, jako např. acinický

karcinom (AciCC) nebo *low-grade* polymorfní adenokarcinom (PAC) jsou indolentní, s relativně nízkým rizikem lokální recidivy a minimálním nebezpečím tvorby vzdálených metastáz. Naproti tomu např. salivární duktální karcinom vytváří mnohotné uzlinové metastázy velmi brzy, roste lokálně agresivně a je spojen s velkým rizikem vzniku vzdálených metastáz a s vysokou mortalitou (12).

2.4. Diferenciálně diagnosticky a prognosticky významné molekulární alterace v nádorech slinných žláz.

Objevy translokací a fúzních onkogenů, které jsou jejich produktem, změnily přístup ke klasifikaci salivárních karcinomů a do značné míry i diagnostické a interpretační postupy. Metody molekulární diagnostiky mají v patologii slinných žláz jak diferenciálně diagnostický význam, tak slouží v klasifikaci některých karcinomů, protože mnohé translokace jsou specifické pro určitou nádorovou jednotku. Nově popsany sekreční karcinom slinných žláz mamárního typu (*Mammary Analogue Secretory Carcinoma* - MASC) byl definován na základě detekce translokace $t(12;15)(p13;q25)$ rezultující v genovou fúzi *ETV6-NTRK3* (13). Tento fúzní transkript *ETV6-NTRK3* nebyl nalezen v žádné jiné nádorové jednotce slinných žláz. Průkaz fúzního transkriptu může mít také prognostický význam. Příkladem je mukoepidermoidní karcinom malých a velkých slinných žláz. Přítomnost fúzního onkogenu *CRTC1-MAML2*, který vzniká translokací $t(11;19)(q14-21;p12-13)$, je spojena s příznivou prognózou (14). Některé genetické alterace jsou relevantní terapeuticky jako možný cíl biologické léčby specifickými inhibitory. Příkladem může být zlom genu *NTRK3* v sekrečním karcinomu (MASC) (15), aktivační mutace genu *NOTCH1* v adenoidně cystickém karcinomu (16) nebo amplifikace genu *HER2-neu* v salivárním duktálním karcinomu (17).

Rozvoj a dostupnost molekulární diagnostiky, především zavedení metod sekvenování nové generace (next generation sequencing - NGS) vedl v poslední době vedl k extenzivním a četným objevům specifických translokací a fúzních onkogenů v mnoha salivárních nádorech (18-19). Přehled nejčastějších mutací a translokací v nádorech slinných žláz je uveden v **Tabulce 1**. Translokace či mutace jsou většinou specifické pro určitou nádorovou jednotku, v některých případech je molekulární profil dokonce součástí definice nádoru v nově připravované klasifikaci WHO (20). Metody molekulární diagnostiky tak výrazně ovlivnily diagnostické a interpretační postupy a mají v onkopatologii slinných žláz v současné době především diferenciálně diagnostický význam (18-19, 21).

Tabulka 1: Klasifikace nádorů slinných žláz, kódovaný gen, mechanismus aktivace a lokalizace na chromozomu.

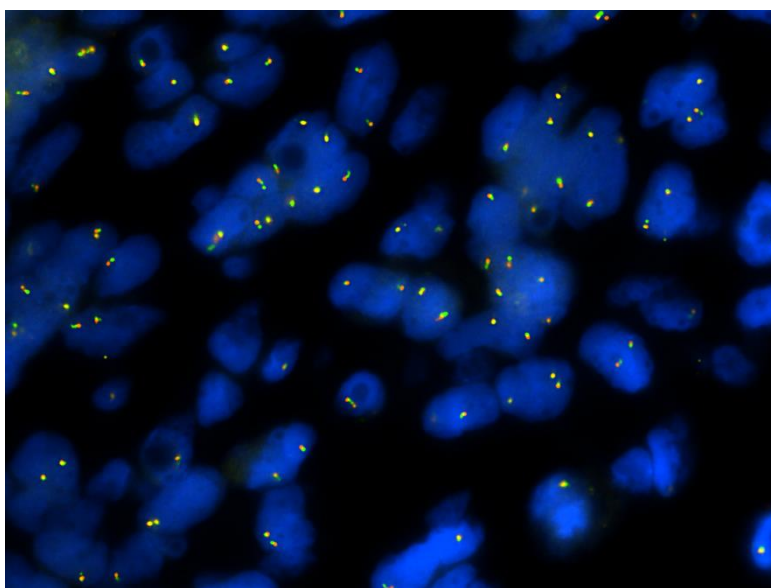
	Gen a mechanismus	Lokalizace na chromozomu
Pleomorfní adenom	PLAG1 fúze HMGA2 fúze	8q12 12q13-15
Bazocelulární adenom	CTNNB1 mutace CTNNB1 mutace AXIN1 mutace APC mutace	3p22.1 16q12.1 16p13.3 5q22.2
Myoepitheliom	PLAG1 fúze	8q12
Sialadenoma papilliferum	BRAF V600E mutace	7q34
Mucoepidermoidní karcinom	CRTC1-MAML2 fúze CRTC3-MAML2 fúze CDKN2A delece	t(11;19) (q21;p13) t(11;15) (q21;q26) 9p21.3
Adenoidní cystický karcinom	MYB fúze MYBL1 fúze NOTCH mutace	6q22-23 8q13 9q34.3
Acinický karcinom	NR4A3 fúze MSANTD3 fúze	9q31 19q31.1
Sekreční karcinom slinných žláz (mammary analogue, MASC)	ETV6-NTRK3 fúze ETV6-RET fúze ETV6-MET fúze ETV6-MAML3 fúze VIM-RET fúze	t(12;15) (p13;q25) t(12;10) (p13;q11) t(12;7) (p13;q31) t(12;4) (p13;q31) t(10;10) (p13;q11)
Mikrosekreční adenokarcinom	MEF2C-SS18 fúze	t(5q14.3) (18q11.2)
Polymorfní adenokarcinom		
Klasický subtyp	PRKD1 mutace	14q12
Kribriformní subtyp	PRKD1 fúze PRKD2 fúze PRKD3 fúze	14q12 19q13.2 2p22.2
Hyalinizující světlobuněčný karcinom	EWSR1-ATF1 fúze EWSR1-CREM fúze	t(12;22) (q21;q12)
Bazocelulární adenokarcinom	CYLD mutace	16q12.1
Intraduktální karcinom		
Subtyp z buněk vmezeřených vývodů	RET fúze	10q11.21
Apokrinní subtyp	PIK3CA mutace HRAS mutace	3q26.32 11p15.5
Salivární duktální karcinom	HER2 amplifikace FGFR1 amplifikace TP53 mutace PIK3CA mutace HRAS mutace AR amplifikace PTEN ztráta CDKN2A ztráta	17q21.1 8p11.23 17p13.1 3q26.32 11p15.5 Xq12 10q23.31 9p21.3
Myoepiteliální karcinom	PLAG1 fúze EWSR1-ATF1 fúze	8q12 t(12,22) (q21;q12)
Epiteliálně-myoepiteliální karcinom	HRAS mutace	11p15.5
Mucinózní adenokarcinom	AKT1 E17K mutace TP53 mutace	14q32.33 17p13.1
Karcinom ex pleomorfní adenom	PLAG1 fúze HMGA2 fúze TP53 mutace	8q12 12q13-15 17p13.1

3. Hlavní molekulární metody využívané v diagnostice nádorů

K diagnostickým, potažmo prognostickým a prediktivním účelům se využívá řada molekulárně genetických a molekulárně cytogenetických metod. Z molekulárně cytogenetických je to především *in-situ* hybridizace, nejčastěji ve formátu fluorescenčním na interfázním jádře a z molekulárně genetických pak základní metodiky, počínaje izolací nukleových kyselin, přes reverzní transkripci (RT), metodiky založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), elektroforetické metody a sekvenační metody první i druhé generace. Dále budou krátce popsány principy metod použité v této práci.

3.1 Fluorescenční *in-situ* hybridizace

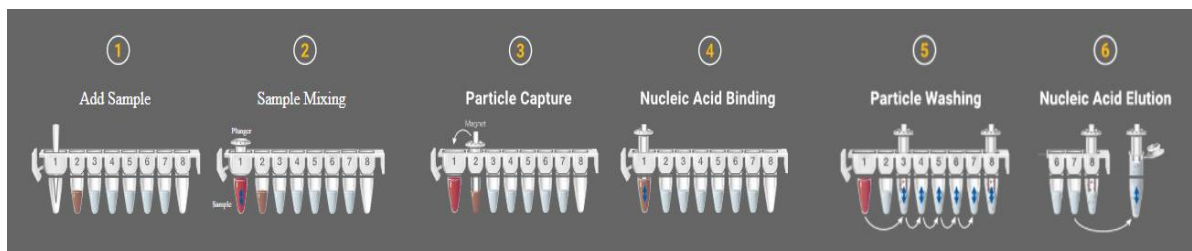
Fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH) vyšetřuje početní či strukturální změny na úrovni genů a chromozomů. Metoda FISH využívá obecnou schopnost DNA opakovaně tvořit jedno nebo dvou řetězcové struktury v závislosti na fyzikálně chemických podmínkách. Samotný princip hybridizace spočívá v navázání řetězce uměle vytvořené a fluorescenčně značené sondy k řetězci analyzované DNA za vzniku hybridního dvou řetězce. Lokalizace hybridizace je závislá na sekvenci použité sondy, která se váže na řetězec studované DNA v místě (lokusu), které je sekvenčně komplementární. V molekulární diagnostice nádorových onemocnění se metoda FISH provádí na interfázních jádrech histologického řezu. Pod fluorescenčním mikroskopem lze detekci fluorescenčních signálů dle konkrétních typů různobarevně značených sond analyzovat delece, amplifikace, zlomy či translokace konkrétních lokusů genomu (22) (Obrázek 3).



Obrázek 3: FISH analýza zlomu genu *HMGA2* pomocí *break-apart* sondy. Modře podbarvená interfázní jádra obsahují fluorescenční oranžovo-žluto-zelené signály indikující intaktní kopie genu *HMGA2* bez rearanže.

3.2 Izolace RNA, DNA

Principem izolace nukleových kyselin je lýze buněk pomocí enzymů, proteináz, a detergentů a následná extrakce a purifikace nukleových kyselin z lyzátu. Vlastní extrakci a purifikaci lze provést řadou různých metodik. Nejčastěji se používá organická extrakce pomocí fenol-chloroformu, extrakce pomocí silikátů a magnetická separace (**Obrázek 4**), existuje však i řada dalších (**23**). Pro svou snadnou automatizaci v poslední době v provozech s vysokým počtem analýz převládla poslední jmenovaná.



Obrázek 4: Systém přípravy izolace RNA nebo DNA za využití paramagnetických kuliček. (Zdroj: <https://worldwide.promega.com/products/lab-automation/maxwell-instruments/maxwell-rsc-instrument/?catNum=AS4500>)

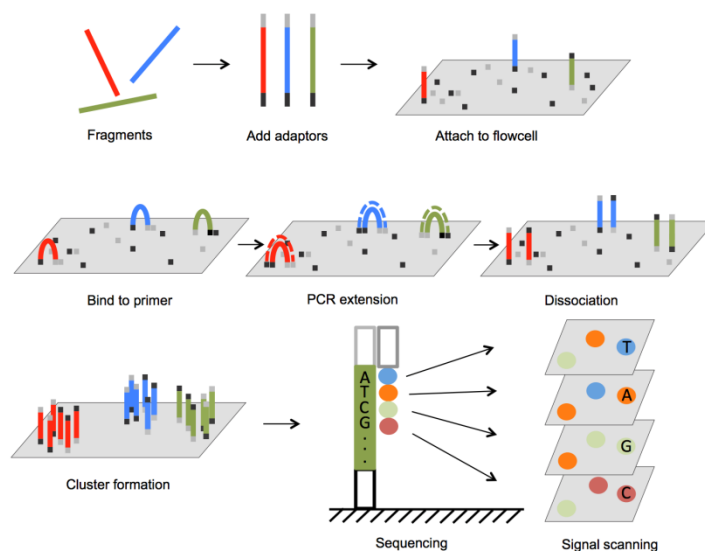
3.3. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, který prostřednictvím RNA – dependentní DNA polymerázy přepisuje sekvenci nukleotidů RNA do DNA struktury. Produktem této reakce je jednovláknová DNA označovaná jako cDNA. Historicky byly používány reverzní transkriptázy jako AMV (izolované z *Avian myeloblastosis virus*) nebo M-MLV (izolované z *Moloney murine leukemia virus*), nicméně v současnosti je zřejmě nejvíce využívanou reverzní transkriptázou enzym z bakterie *Thermus thermophilus* (Tth) a to zejména pro svou termostabilitu. Reverzní transkripce v případě využití Tth probíhá při teplotách 60–70 °C a reakci lze správnout s amplifikačními kroky polymerázové řetězové reakce (PCR) (**24**).

3.4. Sekvenování nové generace

Existuje řada sekvenačních metod. Od sedmdesátých let 20. století byla používána zejména metoda Fredericka Sangera, která využívá inkorporace dideoxynukleotidů (ddNTP) a následnou elektroforézu s vysokým rozlišením. Dnes je Sangerova metoda sekvenování postupně nahrazována „sekvenací nové (druhé) generace“ (*Next-Generation Sequencing* - NGS), nicméně stále je používána například k ověření výsledků NGS. NGS, na rozdíl od Sangerova sekvenování umožňuje masivní a paralelní analýzu mnoha molekul současně.

DNA, popř. cDNA („*complementary DNA*“), je vhodně fragmentována a k fragmentům jsou přisyntetizovány různé krátké oligonukleotidy (adaptéry, indexy, barkódy apod.) o známé sekvenci plnící rozmanité, nejčastěji identifikační funkce a funkce hybridizační kotvy umožňující vlastní sekvenování. Směs takovýchto molekul se nazývá sekvenační knihovna. Tato pak může být sekvenována řadou postupů. V současnosti nejpoužívanější metoda NGS sekvenování je technologie *Illumina*. U této technologie je sekvenační knihovna pomocí adaptéru uchycena na komplementární oligonukleotid imobilizovaný na tzv. „*flowcell*“. Po uchycení molekul DNA na povrch, je každý řetězec DNA namnožen a vzniká klastr identických molekul DNA koncentrovaných v jednom místě, což umožní zesílení výsledného signálu při sekvenování daného úseku DNA. Vlastní sekvenační proces využívá stejného principu jako Sangerovo sekvenování, tj. navázání fluorescenčně značeného nukleotidu do vznikajícího řetězce. Rozdíl je v tom, že po navázání fluorescenčně značeného dNTP s reverzibilně inhibovanou 3' OH skupinou a zastavení replikace, je fluorescenční signál přečten, následně je enzymaticky odstraněn, chemicky je zpřístupněna 3' OH skupina dNTP a probíhá další kolo replikace, tedy přidání další fluorescenčně značené báze. Kamera v každém jednotlivém kole replikace DNA snímá signál z celé destičky (stovky až tisíce klastrů) a detekuje barvu signálu a tím i inkorporovaný nukleotid (25) (Obrázek 5).



Obrázek 5: Postup procesu sekvenování nové generace (<https://www.intechopen.com/chapters/49419>).

Výsledná data se pak řadou bioinformatických procesů zpracovávají až do přesně definovaných sekvencí jednotlivých klastrů. Tyto jsou pak pomocí dalších

bioinformatických utilit porovnávají s databázemi a jsou definovány změny oproti těmto databázím.

4. Cíle práce

Za použití molekulárních genetických metod definovat charakteristické molekulární markery, fúzní transkripty, vybraných nádorových jednotek slinných žláz a v případě nalezení dosud nepublikovaných fúzních transkriptů se pokusit definovat jejich molekulárně biologické konsekvence.

5 Materiál a metody

Materiál: V rámci bakalářské práce bylo zkoumáno 135 formalinem fixovaných v parafinu zalitých (FFPE) nádorových tkání slinných žláz, které byly primárně analyzovány patologií Biopstické laboratoře s.r.o. v rámci běžné rutinní a konzultační praxe v letech 2018-2021. Tato analýza byla provedena pouze v případech, kdy byla nezbytná pro správné stanovení diagnózy. Dále byly testovány vzorky nádorových tkání slinných žláz v rámci dílčích vědeckých projektů. Jedná se tedy o nenáhodný výběr.

V této bakalářské práci se využívaly metody, které jsou po teoretické rovině popsány v kapitole 1.5. Jedná se o metody izolace RNA a DNA, FISH, RT PCR a NGS.

5.1 Izolace DNA a RNA z fixovaného materiálu kitem Maxwell RSC DNA FFPE Kit

Izolace DNA a RNA byla provedena pomocí komerčního soupravy Maxwell RSC DNA FFPE Kit (Promega).

Chemikálie obsažené v kitu: Mineral Oil (25 ml), Lysis Buffer (20 ml), 2 * 1 ml Proteinase K Solution, 100µl Blue Dye, 1 ml RNase A Solution, Nuclease-Free Water (25 ml).

Pomůcky a přístroje: 48 Maxwell® FFPE Cartridges (Promega), 50 CSC/RSC Plungers (Promega), mikrozkuřavky (0,2 ml, 2 ml), 0,5 ml mikrozkuřavky: Qubit Assay Tubes / Axygen PCR-05-C tubes (Promega), pipetovací špičky pro objemy 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, stojánky na mikrozkuřavky, přístroj Maxwell RSC 48 Instrument (Promega), termoblok (Labmark Line), centrifuga (IKA), vortex (IKA), mikropipety, mikrotom (Leica).

Měření koncentrace RNA bylo provedeno po každé izolaci NK kitem Qubit RNA HS Assay Kit (Life Technologies) pomocí přístroje Qubit fluorometer (Life technologies).

Chemikálie Qubit RNA HS Assay Kit (Life Technologies): RNA HS Buffer (B), RNA HS Reagent (R), Standard 1 a 2.

5.1.1 Postup izolace

- Na mikrotomu byly uříznuty dva 10 µm řez FFPE tkáně, které byly vloženy do 2 ml zkumavky.
- Řezy byly pomocí špičky posunuty na dno zkumavky a stočeny v centrifuze.
- Během stáčení byl přehřán jeden termoblok na 56 °C a druhý blok na 80 °C.
- Do zkumavky bylo přidáno 300 µl Mineral Oil, vzorek byl následně vortexován po dobu 10 sekund.
- Po vortexování byl vzorek inkubován v termobloku přehřátého na 80 °C po dobu 2 minut a následně schlazen na PT.
- Ke vzorku bylo poté přidáno 250 µl Lyzační směsi připravené dle rozpisu v Tabulce 2, vzorek byl z vortexován po dobu 5 sekund a následně krátce stočen v centrifuze.

Tabulka 2: Schéma přípravy Lyzační směsi pro 1 vzorek.

Lyzační směs	Objem chemikálií pro jeden vzorek
Lysis Buffer	224 µl
Proteinase K Solution	25 µl
Blue Dye	1 µl

- Takto připravený vzorek byl inkubován v termobloku při 56 °C po dobu 30 minut.
- Po 30 minutách byl vzorek přenesen do druhého bloku (80 °C), kde byl ponechán přes noc.
- Vzorek byl vyjmut z termobloku (80 °C) a schlazen na PT.
- Poté byl podle manuálu výrobce zapnut izolační stroj Maxwell RCS 48 Instrument.
- Z toho byla provedena příprava k vlastní izolaci:
 - Nejprve byla připravena deska, do které byl vložen Maxwell FFPE Cartridge.
 - Do pozice 1 (**viz Obrázek 4**) byla napipetována modrá fáze vzorku.
 - Na Maxwell destičku byla před cartridge umístěna mikrozkušavka, do které bylo napipetováno 70 µl *Nuclease-free water*.
- Po dokončení izolace byla vyjmuty zkumavky s izolovanou NK.
- Poté proběhlo měření koncentrace NK.

5.1.2 Měření koncentrace NK

Koncentrace NK byla měřena pomocí kitu Qubit RNA HS Assay Kit (Life Technologies).

- Nejprve byla provedena příprava roztoku RNA HS Buffer (B) + RNA HS Reagents (R): pro jeden vzorek bylo smícháno 199 μ l B + 1 μ l R.
- Pro každý vzorek a standard byla připravena jedna 0,5 ml zkumavka.
- Kalibrace byla provedena roztoky standardu.
- Roztok B+R byl roypipetován do zkumavek tak, aby celkový objem roztok + vzorek/standard byl 200 μ l, viz **Tabulka 3**.

Tabulka 3: Schéma přípravy roztoků pro měření koncentrace NK a kalibrace přístrojů pomocí roztoků standard.

Příprava pro měření koncentrace	Vzorek/standard	Reagencie (B+R)
Vzorek (μ l)	1-20	180-199
RNA HS Standard 1 / Standard 2 (μ l)	10	190

- Po rozpipetování byly vzorky krátce vortexovány (2–3 sekund) a poté byly inkubovány 2 minuty při PT.
- Měření koncentrace probíhalo na Qubit fluorometer

5.2 Fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH)

Pro vyšetření bioptického materiálu metodou FISH byly použity 4 μ m silné FFPE řezy umístěné na pozitivně nabitá polylysinová mikroskopická skla.

Chemikálie: destilovaná voda, Target Retrieval Solution (Dako), lyofilizát pepsinu (Sigma – Aldrich), 35% HCl (Sigma – Aldrich), 96% etanol (Sigma – Aldrich), SSC roztok (Sigma - Aldrich), Xylen (Sigma – Aldrich), DAPI barvivo (Vysis/Abbott Molecular).

Pomůcky a přístroje: 1,5 ml mikrozkušavky, vortex (IKA), centrifuga (IKA), ThermoBrite přístroje (Vysis/Abbott Molecular), kyvety, vodní lázeň (Memmert), krycí a podložní sklička, mikropipety (ThermoFisher), odměrný válec.

5.2.1 Příprava roztoků

- Pro přípravu všech níže uvedených roztoků byla použita destilovaná voda.

Target Retrieval Solution

- Ze zásobního roztoku 10x Target Retrieval Solution byl vodou naředěn pracovní roztok (1x).
 - 1x Target Retrieval Solution: 1 díl 10x Target Retrieval Sol. + 9 dílů vody.

Proteáza

- Zásobní roztok proteázy byl připraven naředěním lyofilizátu pepsinu vodou na výslednou koncentraci 250 mg/ml.

Roztok 0,01M HCl

- Ze zásobního roztoku 35% HCl byl vodou naředěn pracovní roztok 0,01 M HCl.
 - 0,01 M HCl (1000 ml): 0,88 ml 35% HCl + H₂O do celkového objemu 1000 ml.

Etanolová řada

- Ze zásobního 96% etanolu byly naředěny pracovní roztoky 70% a 85% etanolu.
 - 70% etanol (1000 ml): 730 ml 96% etanolu + 270 ml vody.
 - 85% etanol (1000 ml): 886 ml 96% etanolu + 114 ml vody.

SSC roztoky

- Zásobní 20x SSC roztok byl připraven rozpuštěním 66 g SSC ve vodě o celkovém objemu 250 ml a uchován při PT.
- Ze zásobního 20x SSC roztoku byl připraven pracovní roztok 2x SSC/0,3% NP-40, který byl rovněž uchován při PT.
 - 2x SSC/0,3%-NP-40 1000 ml: 100 ml 20x SSC + 897 ml H₂O + 3 ml NP-40.

5.2.2 Proces postupu metody FISH

Příprava hybridizační směsi

- Mikrozkušavky se sondami byly před otevřením vždy krátce stočeny, protřepány na vortexu a opět stočeny.

Příprava ThermoBrite přístroje

- Před spuštěním přístroje byly ve víku přístroje navlhčeny dva proužky, nutné pro zachování vlhkosti po dobu hybridizace.

Příprava vodní lázně

- Pro vyhřátí kyvet s 1x Target Retrieval Solution na 95 °C; 0,01 M HCl na 37 °C nebo pracovního odmyvacího SSC roztoku na 72 °C posloužila vodní lázeň.
- Pro úplné a správné zahřátí roztoků byla vodní lázeň spuštěna minimálně 40 minut před začátkem procedury.

Odparafinování FISH preparátu

- Preparát byl vložen do kyvety s xylenem na dobu 5 minut při PT.
- Poté byl postup znovu opakován s novým xylenem.
- Preparát byl vložen do kyvety s 96% etanolem na dobu 2 minuty při PT.
- Poté byl předchozí krok znovu opakován s novým 96% etanolem.
- Preparát byl vložen do kyvety s vodou na dobu 5 minut při PT.

Předpůsobení FISH preparátu

- Po odparafinování byl preparát vložen do kyvety s 1x Target Retrieval Solution umístěné ve vodní lázni vytemperované na 95 °C na dobu 40 minut.
- Poté byla kyveta s preparátem z vodní lázně vyjmuta a nechala se chladit při PT po dobu 20 minut.
- Preparát byl vyjmut z kyvety s 1x Target Retrieval Solution a vložil se do jiné kyvety s vodou na dobu 5 minut.

Natravení FISH preparátů

- Preparát byl vyjmut z kyvety s vodou.
- Do kyvety s roztokem 0,01 M HCl, předem vytemperované ve vodní lázni na teplotu 37 °C, byl přidán pepsin ze zásobního roztoku (250 mg/ml) tak, aby výsledná koncentrace pepsinu v pracovním roztoku byla 0,5 mg/ml, obsah byl promíchán.
- Ihned poté byl do kyvety vložen preparát, který byl natráven po standardní dobu 45 minut.
- Pak byl preparát vyjmut a vložen do kyvety s vodou na dobu 5 minut při PT.

Odvodnění preparátu v etanolové řadě

- Preparát byl vložen do kyvety se 70% etanolem na dobu 2 minuty při PT.
- Preparát byl vložen do kyvety s 85% etanolem na dobu 2 minuty při PT.
- Preparát byl vložen do kyvety s 96% etanolem na dobu 2 minuty při PT.
- Po odpaření etanolu byla na řez aplikována připravená hybridizační směs

Denaturace preparátu s hybridizační směsí a hybridizace

- Na příslušné krycí sklo byla aplikována automatickou mikropipetou připravená hybridizační směs sond FUS break apart (Zytovision) EWSR1 break apart (Vysis/Abbott Molecular), PLAG1 a PPARG break apart (Dako).
- Krycí sklo bylo opatrně spojeno s podložním sklem a případné vzduchové bubliny mezi skly byly odstraněny mírným tlakem na krycí sklo.
- Okraje krycího skla byly zalepeny malým množstvím lepidla, které se nechaly 1-2 minuty zaschnout.
- Preparát byl přenesen do přístroje ThermoBrite a byl spuštěn automatický denaturo-hybridizační program (85 °C 8 minut a 37 °C 16 hodin).

Odmytí nespecificky navázané fluorescenční sondy

- Po ukončení doby hybridizace byl preparát vyjmut z přístroje ThermoBrite, pinzetou bylo odstraněno lepidlo a opatrně bylo sejmuto krycí sklíčko.
- Po odstranění krycího skla byl preparát vložen do kyvety s předem připraveným pracovním odmyvacím roztokem 2x SSC/0,3% NP-40 umístěném ve vodní lázni vytemperované na teplotu 72 °C na dobu 2 minuty.
- Poté byl preparát vyjmut z kyvety a nechal se ve tmě ve svislé poloze usušit.

Podbarvení preparátu

- Před vlastním podbarvením preparátu bylo DAPI barvivo vytemperováno na PT.
- Na příslušné krycí sklo bylo aplikováno automatickou mikropipetou odpovídající množství DAPI.
- Krycí sklo bylo opatrně spojeno s podložním sklem a případné vzduchové bubliny mezi skly byly odstraněny mírným tlakem na krycí sklo.
- Přebytek DAPI barviva byl odstraněn přitlačením papírového ubrousku nebo filtračního papíru na krycí sklo.

Analýza dat

Detekce hybridizovaných DNA FISH sond probíhala ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX 51 se 100x zvětšujícím imerzním objektivem a vybaveném specifickými optickými filtry odpovídajícími použitým fluorochromům FISH sond. Obrazová analýza byla provedena pomocí programu Lucia (Laboratory Imaging s.r.o.) Fluorescenční signály

byly v mikroskopickém preparátu hodnoceny minimálně ve 100 nepřekrývajících se jádrech souvislé nádorové tkáně.

U použitých zlomových (*break-apart*) sond bylo jako pozitivní jádro hodnoceno takové, které obsahovalo, mimo negativního fúzního žlutého signálu, také minimálně jednu sadu oddělených oranžových a zelených signálů, mezi nimiž byla vzdálenost odpovídající velikosti 2 a více signálů nebo jádro s jedním oranžovým, resp. zeleným signálem bez odpovídajícího zeleného, resp. oranžového signálu společně s fúzním žlutým signálem.

Pro interpretaci získaných výsledků bylo nutné pro jednotlivé použité typy FISH sond stanovit hranici positivity, tzv. „*cut-off*“ hodnotu, podle které byly nálezy klasifikovány jako pozitivní, respektive negativní. Konkrétní *cut-off* hodnota byla stanovena na vlastní kontrolní skupině, která byla složena z 5 preparátů s normálním histologickým nálezem. Tyto preparáty byly vyšetřeny metodou intrefázické FISH s příslušnými sondami, kde byl hodnocen počet jader s abnormálním nálezem (zlomem). Z tohoto počtu byl stanoven průměr a směrodatná odchylka (*standard deviation* - SD) pro celou kontrolní skupinu. Výsledná *cut-off* hodnota byla pro jednotlivé typy sond dána hodnotou součtu: průměr + 3 SD, zaokrouhleného na celé desítky % nahoru. Jako pozitivní výsledek byl považován takový nález, který byl roven nebo převyšoval hodnotu *cut-off* v procentech z celkového počtu analyzovaných jader.

Pro všechny použité FISH zlomové sondy byla v této práci použita hodnota *cut-off* 10 %.

5.4 Sekvenování druhé generace (NGS)

Chemikálie obsažené v Archer FusionPlex Solid Tumor/ Comprehensive Thyroid Lung Kit (Illumina): 500mM Tris-HCl, 10X VCP Primer Mix, Ligation Cleanup Beads, Ligation Cleanup Buffer, primery GSP1+2, stripy s lyofilizovanými reagensii pro jednotlivé kroky, PCR voda.

Ostatní chemikálie: 70% etanol (Sigma – Aldrich), 10 mM Tris – HCl (Sigma – Aldrich), 5 mM NaOH (Sigma – Aldrich), 0,2 N NaOH (Sigma – Aldrich), 0,03 – 0,06% NaOCl (Sigma – Aldrich), 0,05% Tween20 (Sigma – Aldrich).

Pomůcky a přístroje: NextSeq 500 (Illumina), Qubit (Life Technologies), mikropipety (ThermoFisher), vortex (IKA), mikrozkušavky, termocykler (SimpliAMP), centrifuga (IKA), magnetický stojánek, MBC adaptory, BIORAD platíčka/stripy, AMPure (Agencourt).

5.4.1 Postup přípravy vzorku na NGS

Random Priming

- Nejprve byla změřena koncentrace RNA na Qbitu a vzorky byly naředěny na potřebnou koncentraci (20 – 250 ng).
- Poté bylo na led připraveno požadované množství zkumavek s lyofilizovanou „*random priming*“ směsí a přidáno 20 µl RNA.
- Tato reakční směs byla rozpuštěna, zvortexována, stočena a následně vrácena na led.
- Do předehřátého cyklu (65 °C) byly přeneseny vzorky s reakční směsí a spuštěn program (program: NGS/Random Priming; 65 °C/5 minut, 4 °C/Hold).
- Po skončení byly vzorky znovu stočeny a vráceny zpět na led.

Syntéza 1. Vlákná cDNA

- Na led bylo znovu umístěno požadované množství zkumavek s lyofilizovanou směsí pro syntézu 1. vlákná cDNA, do kterých bylo přidáno 20 µl produktu z předchozí reakce.
- Následovalo rozpuštění směsi, která byla poté zvortexována, stočena a vrácena zpět na led.
- Reakční směs byla přenesena do cyklu a byl spuštěn program (program: NGS/First strand cDNA; 25 °C/10 minut, 42 °C/30 minut, 80 °C/20 minut, 4 °C/Hold).
- Po skončení programu byly produkty stočeny a přemístěny zpět na led.
- V tomto kroku bylo pro následnou kontrolní reakci amplifikovatelnosti odebráno z každého produktu 1 µl a zředěno 9 µl deionizované vody.

Syntéza 2.vlákná cDNA

- Na led bylo připraveno stejné množství zkumavek jako v předchozích krocích s lyofilizovanou směsí pro syntézu 2. vlákná cDNA.
- Ke každému produktu z předchozího kroku bylo přidáno 21 μ l deionizované vody a celý objem (40 μ l) byl přenesen do zkumavek připravených na začátku tohoto postupu.
- Reakční směs byla zvortexována, stočena a uložena na led.
- Takto připravené reakční směsi byly umístěny do cykleru, kde byl spuštěn program (NGS/Second strand cDNA; 16 °C/60 minut, 75 °C/20 minut, 4 °C/Hold).
- Po ukončení programu byly produkty stočeny a umístěny na led.

PreSeq RNA QC assay – kontrola amlifikovatelnosti produktu

- Nejprve byl ponechán 10X VCP Primer Mix rozmrazit v PT.
- Dále byla připravena reakční směs (**Tabulka 4**) pro požadovaný počet vzorků a následně byl tento mix rozpipetován do zkumavek vhodných pro *real-time* PCR.
- Takto připravené reakce byly přeneseny do cykleru pro *real-time* a byl spuštěn program (program: Archer preseq: 95 °C/5 minut, (95 °C/15 sekund/60 °C/60 sekund) 35x, 60 °C/5 sekund).
- Po skončení programu byla data vyexportována a nahrána do příslušného pracovního protokolu.

Tabulka 4: Popis přípravy reakční směsi pro PreSeq RNA QC assay.

Reakční směs	1 vzorek
iTaq SYBR Green Supermix	5 μ l
10X VCP Primer Mix	1 μ l
zřed. vzorek/NTC	4 μ l
TOTAL	10 μ l

End Repair

- Bylo připraveno požadované množství zkumavek s lyofilizátem pro End Repair reakci.
- Do zkumavek bylo přidáno 40 μ l produktu ze Second Strand cDNA Synthesis reakce.
- Reakce byly zvortexovány, stočeny a uloženy na led.

- Dále byly přeneseny do cykleru, kde byl nastaven program (program: NGS/End Repair: 25 °C/30 minut, 4 °C/Hold).
- Po ukončení programu byly vzorky krátce stočeny a uloženy zpět na led.

AMPURE čištění

- Ke každému vzorku bylo přidáno 100 µl AMPure magnetických kuliček, 10x promícháno pipetou a inkubováno 5 minut v PT.
- Poté byly směsi přemístěny na magnetický stojánek a inkubovány 4 minuty, byl odstraněn supernatant bez narušení peletu.
- Poté bylo přidáno 200 µl čerstvě namíchaného 70 % etanolu, promícháno a odstraněn supernatant, pak byl celý tento proces zopakován.
- Po opakování procesu byly zkumavky se směsí umístěny na magnetický stojánek a zde byly sušeny po dobu 5 minut.
- Po odstranění magnetu byl pelet rozpuštěn ve 20 µl 10mM Tris-HCl.
- Takto rozpuštěný pelet, byl přendán na magnetický stojánek po dobu 2 minut.
- Po 2 minutách bylo opatrně odebráno 20 µl supernatantu do dalšího kroku.

Ligace 1

- Do připravených zkumavek s lyofilizátem pro Ligaci 1 bylo napipetováno 20 µl produktu z předchozího čištění.
- Směsi se nechaly rozpustit, zvortexovat, stočit a poté byly uloženy na led.
- Poté byly reakční směsi umístěny do cykleru, kde byl nastaven program (program: NGS/Archer st1 ligace: 37 °C/15 minut, 4 °C/Hold).
- Po ukončení programu byly vzorky krátce stočeny a uloženy zpět na led.

AMPURE čištění

- Ke každému vzorku bylo přidáno 50 µl AMPure, 10x promícháno pipetou a inkubováno 5 minut v PT.
- Poté byly vzorky přemístěny na magnetický stojánek a inkubovány 4 minuty, byl odstraněn supernatant bez narušení peletu.
- Poté bylo přidáno 200 µl čerstvě namíchaného 70 % etanolu, promícháno a odstraněn supernatant, pak byl celý tento proces zopakován.
- Po opakování procesu byly vzorky umístěny na magnetický stojánek a zde byly sušeny po dobu 5 minut.

- Po odstranění magnetu byl pelet rozpuštěn ve 42 μ l 10 mM Tris-HCl.
- Takto rozpuštěný pelet, byl přendán na magnetický stojánek po dobu 2 minut.
- Po 2 minutách bylo opatrně odebráno 20 μ l supernatantu do dalšího kroku.

Inkorporace MBC adapterů (*barcoding*)

- Byly připraveny zkumavky s vybranými MBC adaptéry, do kterých bylo napipetováno 40 μ l supernatantu z předchozího kroku.
- Tyto vzorky byly zvortexovány, stočeny a uloženy na led.

Ligace 2

- Do připravených zkumavek s lyofilizátem pro Ligaci 2 bylo napipetováno 40 μ l produktu z předchozího kroku.
- Reakční směsi se nechaly rozpustit, zvortexovat, stočit a poté byly uloženy na led.
- Poté byly umístěny do cykleru, kde byl nastaven program (program: NGS/Archer st2 ligace: 22 °C/5 minut, 4 °C/Hold).
- Po ukončení programu byly produkty krátce stočeny a uloženy na led.

Ligation Cleanup Beads čištění

- Pro každý vzorek bylo napipetováno 50 μ l Ligation Cleanup kuliček, vzorky byly přemístěny na 1 min na magnetický stojánek, byl odstraněn supernatant a přidáno 50 μ l Ligation Cleanup Buffer.
- Poté byl přidán celý objem z předchozího kroku Ligace 2.
- Následovalo vortexování a inkubace směsi po dobu 5 minut (celý proces se opakoval 2x po sobě).
- Tyto směsi byly krátce stočeny a přemístěny na 1 minutu na magnetický stojánek, pak byl odstraněn supernatant bez narušení peletu.
- Ke každému vzorku bylo přidáno 200 μ l Ligation Cleanup Buffer, pak byly vzorky zvortexovány, krátce stočeny a přemístěny na 1 minutu na magnetický stojánek, kde byl odstraněn supernatant, celý proces byl opakován.
- Následující krok byl podobný tomu předchozímu, ale bylo přidáno 200 μ l deionizované vody, vzorky poté byly zvortexovány, stočeny a přemístěny na 1 minutu na magnetický stojánek, kde byl odstraněn supernatant.
- pelet byl poté rozpuštěn v 18 μ l 5 mM NaOH a produkty umístěny do cykleru s nastaveným programem (NGS/VariantPlexLigElu: 75 °C/5 minut, 4 °C/Hold).

PCR1

- Do připravených zkumavek lyofilizátem pro PCR1 bylo napipetováno 2 µl GSP1 (specifického pro daný kit) a 18 µl produktu z předchozího kroku.
- Směsi se nechaly rozpustit, zvortexovat, stočit a poté byly uloženy na led.
- Poté byly směsi umístěny do cykleru, kde byl nastaven program (program: NGS/First PCR: 95 °C/3minuty, (95 °C/30 sekund, 65 °C/5 minut – 100 % ramp rate) 15x, 72 °C/3 minuty, 4 °C/Hold).
- Po ukončení programu byly produkty krátce stočeny a uloženy na led.

AMPURE čištění

- Ke každému produktu bylo přidáno 24 µl AMPure, 10x promícháno pipetou a inkubováno 5 minut v PT.
- Poté byly směsi přemístěny na magnetický stojánek a inkubovány 4 minuty, byl odstraněn supernatant bez narušení peletu.
- Poté bylo přidáno 200 µl čerstvě namíchaného 70 % etanolu, promícháno a odstraněn supernatant, pak byl celý tento proces zopakován.
- Po opakování procesu byly zkumavky umístěny na magnetický stojánek a zde byly sušeny po dobu 3 minut.
- Ze zkumavek byl odebrán pelet a supernatant byl rozpuštěn v 24 µl 10mM Tris-HCl.
- Takto rozpuštěný supernatant byl přendán na magnetický stojánek po dobu 2 minut.
- Po 2 minutách bylo opatrně odebráno 22 µl supernatantu do dalšího kroku.

PCR2

- Do připravených zkumavek s lyofilizátem pro PCR2 bylo napipetováno 2 µl GSP2 (specifického pro daný kit) a 18 µl supernatantu z předchozího kroku.
- Směsi se nechaly rozpustit, zvortexovat, stočit a poté byly uloženy na led.
- Poté byly umístěny do cykleru, kde byl nastaven program (program: NGS/Second PCR: 95 °C/3 minuty, (95 °C/30 sekund, 65 °C/5 minut – 100 % ramp rate) 20x, 72 °C/3 minut, 4 °C/Hold).
- Po ukončení programu byly produkty krátce stočeny a uloženy na led.

AMPURE čištění

- Ke každému vzorku bylo přidáno 24 μ l AMPure magnetických kuliček, 10x promícháno pipetou a inkubováno 5 minut v PT.
- Poté byly směsi produktu a kuliček přemístěny na magnetický stojánek a inkubovány 4 minuty, byl odstraněn supernatant bez narušení peletu.
- Poté bylo přidáno 200 μ l čerstvě namíchaného 70 % etanolu, promícháno a odstraněn supernatant, pak byl celý tento proces zopakován.
- Po opakování procesu bylo vzorky umístěny na magnetický stojánek a zde byly sušeny po dobu 3 minut.
- Ze zkumavek byl odebrán pelet a zbylý supernatant byl rozpuštěn v 24 μ l 10 mM Tris-HCl.
- Takto rozpuštěný supernatant byl přendán na magnetický stojánek po dobu 2 minut.
- Po 2 minutách bylo opatrně odebráno 22 μ l supernatantu do dalšího kroku.

KAPA Kvantifikace

- Po finálním přečištění byla provedena kvantifikace pomocí kitu KAPA Library Quantification for Illumina library, amplifikující produkty opatřené specifickými adaptéry
- Pro KAPA qPCR (kvantitativní PCR) kvantifikaci bylo potřeba vzorky naředit 1:100000
- Ředění:
 - příprava 10 mM Tris-HCl/Tween pufru: 200 μ l 500 mM Tris-HCl + 9.8 ml deionizované vody + 5 μ l Tween20
 - ředění 1:100 - 2 μ l vzorku + 198 μ l Tris-HCl/Tween pufru
 - ředění 1:10000 - 2 μ l vzorku + 198 μ l Tris-HCl/Tween pufru
 - ředění 1:100000 - 10 μ l vzorku + 90 μ l Tris-HCl/Tween pufru
- KAPA reakční směs byla připravena pro požadovaný počet vzorků + 10 % navíc (**Tabulka 5**).
- Poté byly vzorky rozpipetovány do BIORAD platička/stripů s víčky k tomu určených v pořadí (**Tabulka 6**).
- Poté byly vzorky umístěny do real-time cykleru, kde byl nastaven program (program: Archer KAPA quantification: 95 °C/5 minut, (95 °C/30 sekund, 60 °C/45 sekund) 34x, 65 °C/5 sekund).

Tabulka 5: Příprava KAPA Master Mixu.

KAPA Master Mix	1 vzorek
SYBR	12 μ l
voda	4 μ l
zřed. vzorek/standard/NTC	4 μ l
TOTAL	20 μl

Tabulka 6: Rozmístění vzorků na BIORAD platíčku.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St1	St1	St1	vz1			vz1			vz1		
B	St2	St2	St2	vz2			vz2			vz2		
C	St3	St3	St3	vz3			vz3			vz3		
D	St4	St4	St4	vz4			vz4			vz4		
E	St5	St5	St5	vz5			vz5			vz5		
F	St6	St6	St6	vz6			vz6			vz6		
G	NTC	NTC	NTC	vz7			vz7			vz7		
H	NTC	NTC	NTC	vz8			vz8			vz8		

5.4.2 Sekvenování NGS vzorků (NextSeq 500) a analýza získaných dat

Jednotlivé produkty tzv. Sekvenační knihovny byly equimolárně smíchány a finální směs byla zředěna na výslednou koncentraci na 4 nM. Směs knihoven byla dále zředěna na výslednou koncentraci 1,6 pM a s pomocí 20 % 1,8 pM PhiX naložena na *NextSeq* sekvenační kazetu a sekvenována na sekvenátoru *NextSeq* 500. Optimální počet čtení na vzorek byl nastaven na 1 500 000 resp. 3 000 000. Výsledné FASTQ soubory byly analyzovány s použitím Archer Analysis software. Parametry pro pozitivní nález fúze byly nastaveny na 5 platných fúzních čtení a 3 unikátní starty.

6. Výsledky

Pomocí metody NGS bylo od roku 2018 vyšetřeno celkem 135 pacientů s tumorem slinných žláz. U 109 případů různých nádorových jednotek (80,5 %) byl nalezen fúzní transkript. V souboru bylo celkem 38 případů adenoidně cystického karcinomu, fúzní transkript *MYB-NFIB* byl nalezen ve 24 nádorech (63 %). U 6 případů světlobuněčného hyalinizujícího karcinomu byla dokumentována fúze genu *EWSR1* v 67 % případů (4/6). Myoepiteliální karcinom a světlobuněčný myoepiteliální karcinom byl charakterizován fúzí genu *PLAG1* v 91,5 % a 100 % případů. U jednoho případu myoepiteliálního karcinomu, byl vedle charakteristické fúze *CHCHD7-PLAG1* nalezen i další fúzní transkript *FUS-GIPR*. U intraduktálního karcinomu se vyskytovala fúze *RET* v 57,1 % případů, zbylé objevené fúze *TUT1-ETV5* a *IRF2BP2-NTRK1* byly zastoupeny v 7,1 % případů. Z celkového počtu 21 analyzovaných případů mukoepidermoidního karcinomu byla nalezena fúze genu *MAML2* s genem *CRTC1* nebo *CRTC3* v 18 nádorech (85,7 %). Pleomorfní adenom v našem souboru vykazoval zejména fúze *HMGA2* (91,5 %), méně často s *PLAG1* (8,5 %). Onkocytární pleomorfní adenom a onkocytární benigní myoepiteliom byl diagnosticky definován fúzí genu *PLAG1*, která byla v této speciální morfologické variantě přítomná ve 100 % případů. Sekreční karcinom byl zkoumán v 25 případech, zlom v genu *ETV6* byl nalezen v 88 %, z toho fúze genů *ETV6-NTRK3* se prokázala v 18 případech (72 %), *ETV6-RET* ve 4 případech (20 %) a *VIM-RET* fúze se prokázala pouze u jednoho případu (4 %). Do různorodé skupiny nádorů zahrnutých v oddílu varia pak spadají následující tumory nalezené vždy po jednom exempláři. Benigní onkocytom, u kterého byla objevena fúze *FUS-PPARG*. Do této skupiny byl zařazen i z morfologického hlediska zcela neznámý nádor s fúzí *EWSR1-NACCI* (**Tabulka 7**).

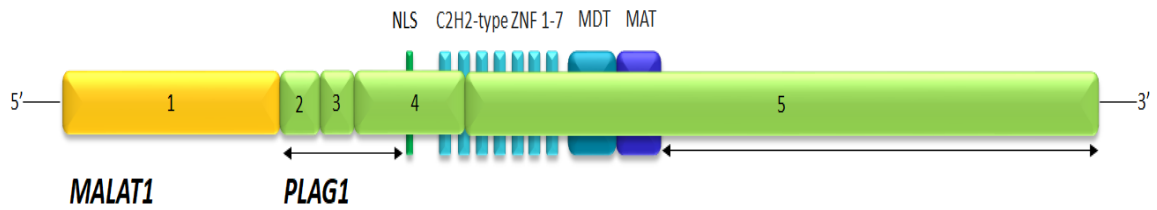
V době analýzy byly některé detekované fúzní transkripty v literatuře dosud nepopsány. Některé z nich, konkrétně *EWSR1-CREM*, *FUS-GIPR*, *KIAA1217-RET*, *TUT1-ETV5*, *NTF3-PLAG1*, *VIM-RET* a *EWSR1-NACCI*, pak byly během zpracovávání bakalářské práce publikovány v literatuře (**viz Diskuze**). V současnosti jsou tedy v dostupných publikacích dosud nepopsané následující fúzní transkripty: *MALAT1-PLAG1*, *HMGA2-FLJ41278*, *FUS-PPARG* (**Tabulka 7, Obrázek 6 A-C, Obr 7 A-C**). Tyto byly, s výjimkou fúze *HMGA2-FLJ41278*, která vzniká jako produkt inverze blízkých genů (**viz. Diskuze**), dodatečně potvrzeny pomocí FISH s dostupnými *break apart* sondami k průkazu zlomů jednotlivých genů (**Tabulka 8, Obrázek 8, 9, 10, 11**).

Tabulka 7: Zaznamenané výsledky nádorů slinných žláz od roku 2018 s vykázanými fúzemi.

Salivární nádor	Subtyp	Fúze	Počet pozitivních/celkem	Nová fúze	FISH
adenoidně cystický karcinom	adenoidně cystický karcinom	<i>MYB-NFIB</i>	24/38		
světlobuněčný hyalinizující karcinom	světlobuněčný hyalinizující karcinom	<i>EWSR1-CREM</i>	2/6		
		<i>EWSR1-ATF1</i>	2/6		
myoepiteliální karcinom	světlobuněčný myoepiteliální karcinom	<i>LIFR-PLAG1</i>	2/2		
	myoepiteliální karcinom	<i>CTNNB1-PLAG1</i>	4/12		
		<i>LIFR-PLAG1</i>	3/12		
		<i>FGFR1-PLAG1</i>	3/12		
		<i>CHCHD7-PLAG1/FUS-GIPR*</i>	1/12		
intraduktální karcinom	intraduktální karcinom	<i>NCOA4-RET</i>	5/14		
		<i>KIAA1217-RET *</i>	1/14		
		<i>TUT1-ETV5 *</i>	1/14		
		<i>TRIM27-RET</i>	2/14		
		<i>IRF2BP2-NTRK1</i>	1/14		
mukoepidermoidní karcinom	mukoepidermoidní karcinom	<i>CRTC1-MAML2</i>	16/21		
		<i>CRTC3-MAML2</i>	2/21		
pleomorfní adenom a myoepiteliom	pleomorfní adenom	<i>MALAT1-PLAG1</i>	1/12	ano	<i>PLAG1</i> break apart
		<i>HMGA2-WIF1</i>	8/12		
		<i>HMGA2-FLJ41278</i>	2/12	ano	<i>HMGA2</i> break apart
		<i>HMGA2-FHIT</i>	1/12		

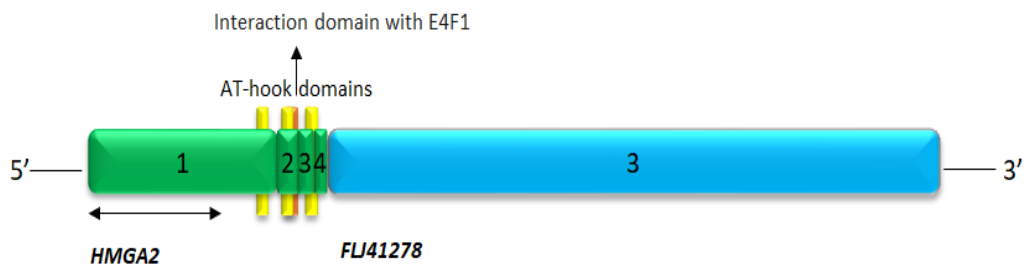
Salivární nádor	Subtyp	Fúze	Počet pozitivních/celkem	Nová fúze	FISH
pleomorfni adenom a myoepiteliom	onkocytární pleomorfni adenom	<i>CHCHD7-PLAG1</i>	1/2		
		<i>GEM-PLAG1</i>	1/2		
	onkocytární myoepiteliom	<i>NTF3-PLAG1*</i> (2021)	1/1		
sekreční karcinom	sekreční karcinom	<i>ETV6-NTRK3</i>	18/25		
		<i>ETV6-RET</i>	4/25		
		<i>VIM-RET*</i>	1/25		
varia	onkocytom	<i>FUS-PPARG</i>	1/1	ano	<i>FUS/PPARG</i> break apart
	neznámý onkocytární nádor malé slinné žlázy	<i>EWSR1-NACCI*</i> (2020)	1/1		

A. *MALAT1* – *PLAG1* fúzní transkript

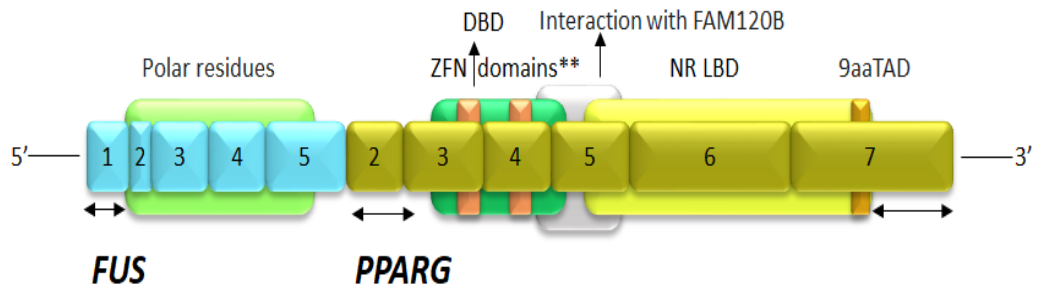


MALAT1 NR_002819.4 : exon1(chr11:q13.1) – *PLAG1* NM_002655.2: exon 2 (chr8:q12.1)

B. *HMGA2* – *FLJ41278* fúzní transkript

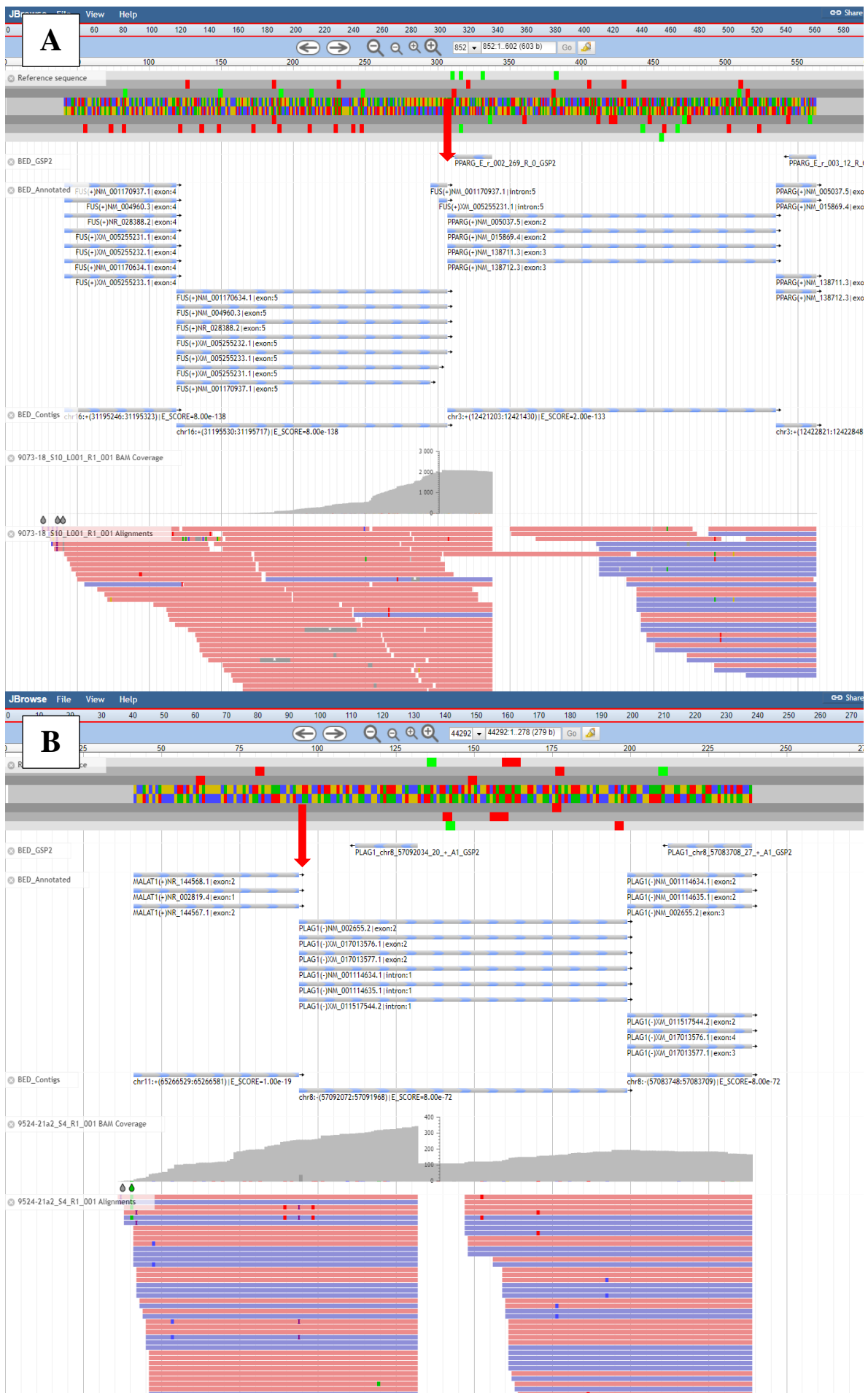


C. *FUS* – *PPARG* fúzní transkript

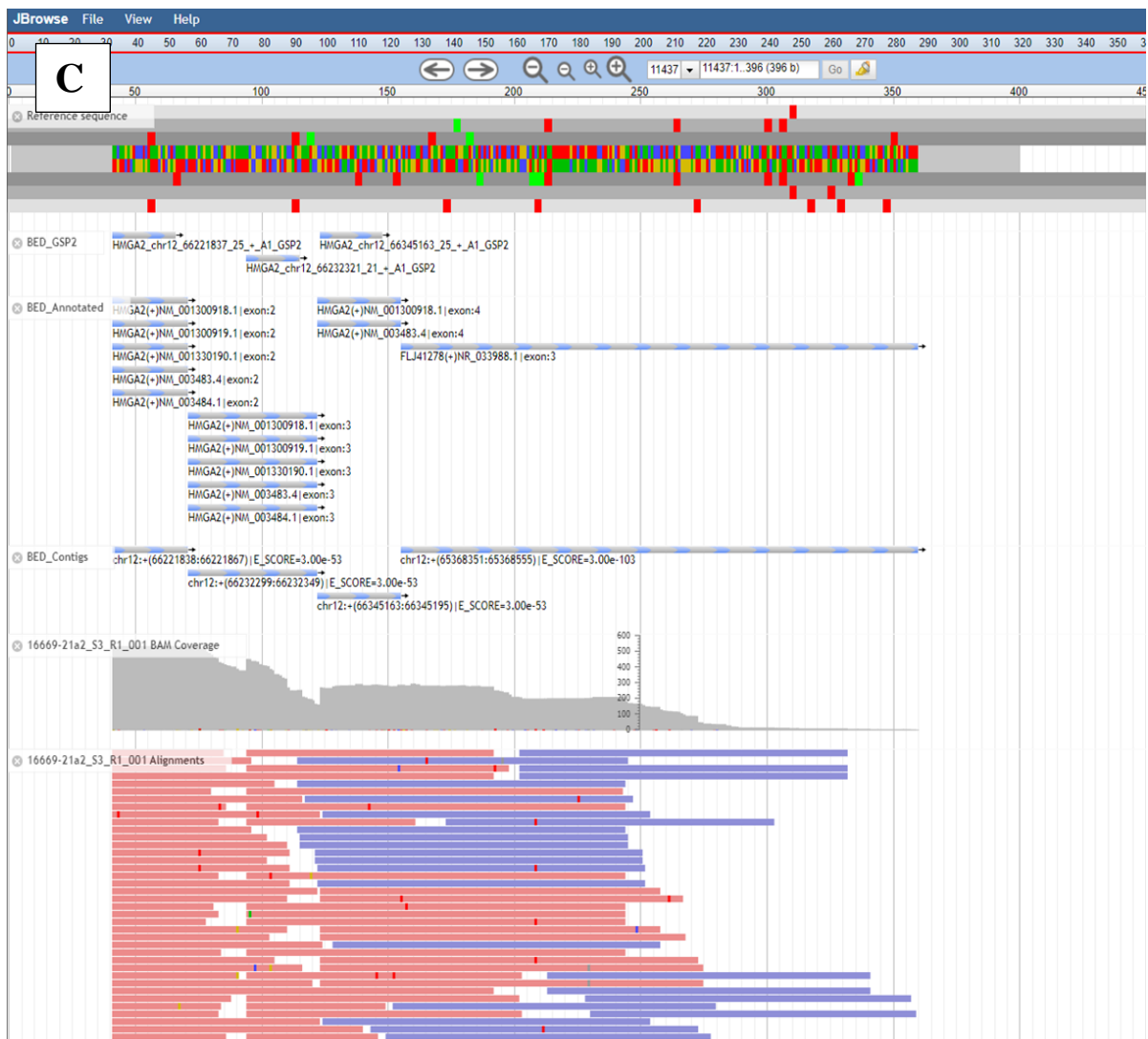


FUS NM_004960.3 : exon5(chr16:p11.2) – *PPARG* NM_015869.5: exon2 (chr3:p25.2)

Obrázek 6: Schématické zobrazení nově objevených fúzí – zobrazení exonů a proteinových domén. A – fúzní transkript *MALAT1-PLAG1* se spojením exonu 1 genu *MALAT1* a exonu 2 genu *PLAG1*. B – fúzní transkript *HMGA2-FLJ41278* se spojením exonu 4 genu *HMGA2* a exonu 3 genu *FLJ41278*. C – fúzní transkript *FUS-PPARG* se spojením exonu 5 genu *FUS* a exonu 2 genu *PPARG*.



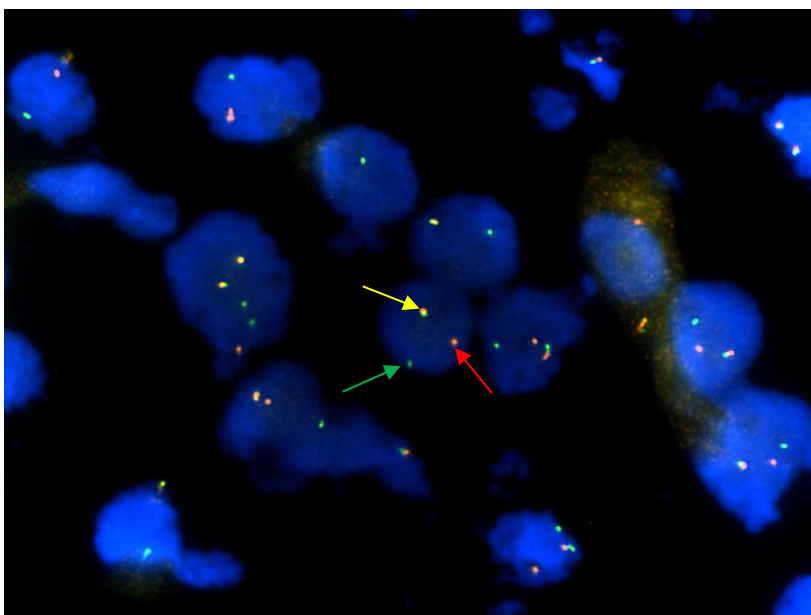
Obrázek 7 A - B: Bioinformatické výsledky NGS, kde se prokázaly fúze *FUS* – *PPARG* (A) a *MALAT1* – *PLAG1* (B). Šipka vyznačuje místo spojení. Zobrazena anotace, hustota pokrytí (šedá) a jednotlivé „ready“ (červená a modrá).



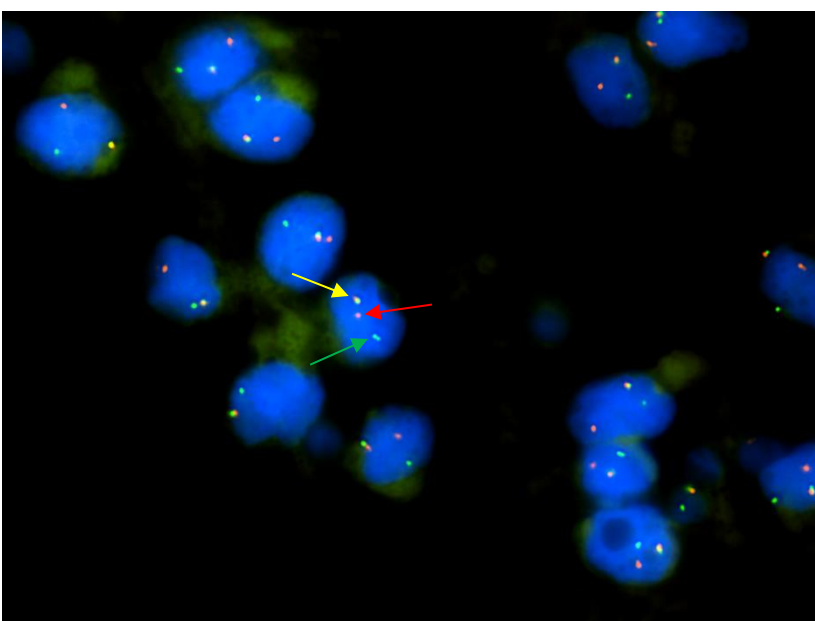
Obrázek 7 C: Bioinformatické výsledky NGS, kde se prokázala fúze *HMGA2* – *FLJ41278*. Šipka vyznačuje místo spojení. Zobrazena anotace, hustota pokrytí (šedá) a jednotlivé „ready“ (červená a modrá).

Tabulka 8: Konfirmace nově nalezených fúzí pomocí metody FISH (* viz Diskuze).

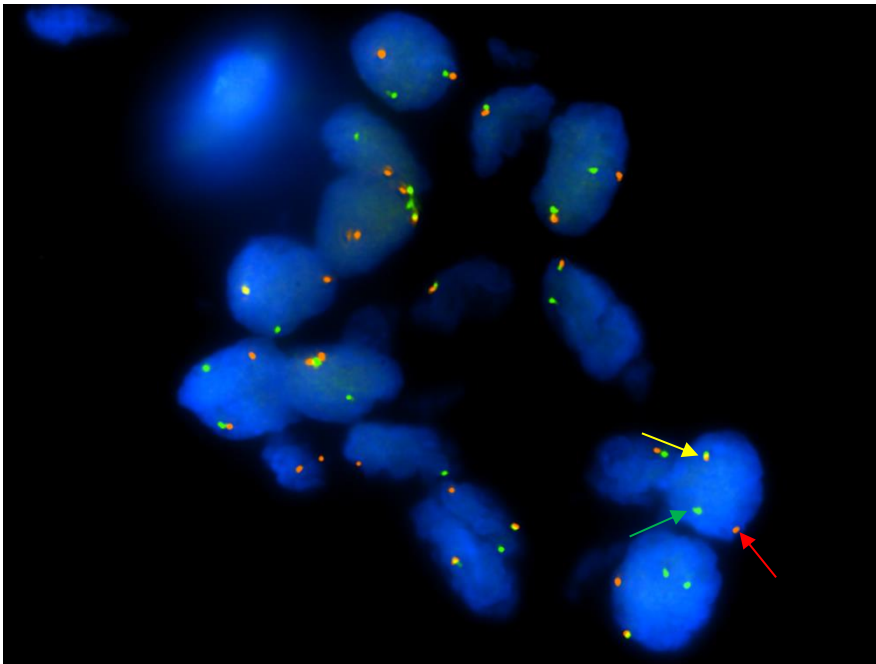
Název fúze	Lokalizace na chromozomu	FISH	Typ sondy
<i>MALAT1 – PLAG1</i>	8q12	Pozitivní	<i>PLAG1 break apart</i>
<i>FUS - PPARG</i>	16p11.2	Pozitivní/Pozitivní	<i>FUS break apart+ PPARG break apart</i>
<i>HMGA2-FLJ41278</i>	12q14.3	Negativní	<i>HMGA2 break apart*</i>



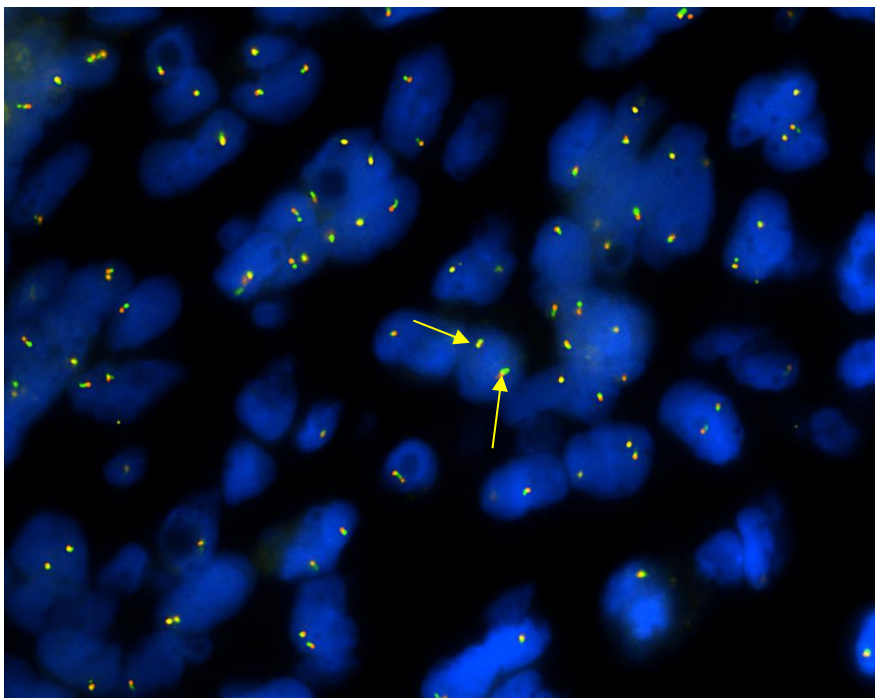
Obrázek 8: Prokázání zlomu *PLAG1* pomocí *break apart* sondy. Žlutá šipka zobrazuje intaktní gen, červená a zelená – zlom.



Obrázek 9: Prokázání zlomu *PPARG*, pomocí *break apart* sondy. Žlutá šipka zobrazuje intaktní gen, červená a zelená – zlom.



Obrázek 10: Prokázání zlomu *FUS*, pomocí *break apart* sondy. Žlutá šipka zobrazuje intaktní gen, červená a zelená – zlom.



Obrázek 11: Negativní výsledek analýzy zlomu genu *HMGA2* pomocí *break apart* sondy. Žlutá šipka zobrazuje intaktní gen.

7. Diskuze

Vzhledem k histomorfologické variabilitě maligních nádorů slinných žláz se jako slibný diagnostický nástroj jeví užití molekulárně-genetických metod ke stanovení rekurentních genových alterací. V posledních letech došlo k objevu několika translokací, které jsou specifické pro určité typy salivárních nádorů (18). V průběhu přípravy bakalářské práce bylo pomocí NGS nalezeno v naší laboratoři značné množství genových aberací v nádorech slinných žláz, které potvrzují výskyt rekurentně se objevujících translokací, ale byly nalezeny i zcela nové, doposud nepopsané onkogenní fúze.

U adenoidně cystického karcinomu (AdCC) jsme potvrdili výskyt známého fúzního transkriptu *MYB-NFIB* v 63 % procentech případů. AdCC je druhým nejčastějším maligním salivárním nádorem v dutině ústní, vyskytuje se také v horním respiračním traktu, a velkých slinných žlázách. Přestože AdCC roste pomalu, v dlouhodobém horizontu se jedná o prognosticky velmi závažnou malignitu, která má výraznou tendenci k infiltrativnímu růstu s perineurálním šířením, k lokálním recidivám a k pozdnímu zakládání vzdálených metastáz, a je charakterizován vysokou mortalitou. V diagnosticky nejasných případech je možno využít přítomnosti rekurentní translokace t(6;9)(q22-23;p23-24) vedoucí ke vzniku fúzního genu *MYB-NFIB*, kterou lze detekovat až v 86 % případů AdCC (26, 27).

Z molekulárně biologického hlediska dochází k zvýšení exprese transkripčního faktoru MYB, který je ve fúzním proteinu zachován téměř kompletní, prostřednictvím ztráty negativně regulačních oblastí pro microRNA v 3'UTR („untranslated region“) a jejich nahrazení koncovou částí proteinu NFIB. Takto „overexprimovaný“ protein MYB pak aktivuje geny, jež souvisí s kontrolou buněčného cyklu (geny *CCNB1*, *CDC2*, *MAD1L1*), apoptózou (geny *API5*, *BCL2*, *BIRC3*, *HSPA8*, *SET*), růstem a angiogenezí (geny *MYC*, *KIT*, *VEGFA*, *FGF2*, *CD53*) a buněčnou adhezí (gen *CD34*) (28).

Světlobuněčný hyalinizující karcinom je nízcí maligní karcinom vycházející hlavně z malých slinných žláz orofaryngu, patra a bukální sliznice, charakterizovaný specifickou rekurentní genovou fúzí *EWSR1-ATF1* (29). V uvedené studii byla alterace *ATF1* genu potvrzena FISH analýzou ve 13/14 *EWSR1*-alterovaných nádorů, což představuje 93 % případů (29). V naší studii byla nalezena fúze genu *EWSR1* jen v 67 % případů světlobuněčného hyalinizujícího karcinomu, což je dáno chybou malých čísel. Vedle typické translokace *EWSR1-ATF1* byla popsána ve 2 případech světlobuněčných karcinomů s výraznou mucinozní komponentou další translokace *EWSR1-CREM* (30).

Gen *EWSRI* je lokalizovaný na chromozómu 22q12.2. Kóduje multifunkční protein z rodiny TET(FET) proteinů účastnící se řady buněčných procesů jako je genová exprese, buněčná signalizace, transport a úprava RNA apod. Protein obsahuje N-terminální „*SYGQ-rich*“ transkripci aktivující doménu (TAD), centrální RNA vazebnou doménu, C-terminální DNA vazebnou doménu a několik „*RRG-rich*“ oblastí, které ovlivňují vazbu na RNA (31, 32). Geny *ATF1* a *CREM* kódují transkripční faktory z rodiny bZIP (*basic-region leucine zipper*) (33).

Gen *EWSRI* je jeden z nejčastěji fúzovaných genů v nádorových onemocněních, zejména sarkomech (31). Obecně platí, že chimerický protein obsahuje N-terminální TAD genu *EWSRI* a C-terminální DNA vazebnou doménu fúzovaného transkripčního faktoru. Tento fúzní protein je pak pod vlivem promotoru *EWSRI* genu a výsledkem je pak zejména, nikoliv však výhradně, zvýšená exprese biologicky aktivní části fúzovaných transkripčních faktorů, včetně výše zmíněných genů *ATF1* a *CREM*.

Myoepiteliální karcinom a světlobuněčný myoepiteliální karcinom byl charakterizován fúzí genu *PLAG1* v 91,5 % a 100 % případů (34). U jednoho případu myoepiteliálního karcinomu, byl vedle charakteristické fúze *CHCHD7-PLAG1* nalezen i další dosud nepopsaný fúzní transkript *FUS-GIPR* (34). Alterace *PLAG1* a také *HMGA2* genů jsou typickým nálezem v pleomorfním adenomu (PA) slinných žláz (viz dále) (35). Nález alterace *PLAG1* genu v tak vysokém procentu případů myoepiteliálních karcinomů ukazuje na patogenetickou spojitost z tohoto typu karcinomu s PA.

Pleomorfní adenom (PA) je z molekulárně-genetického hlediska charakterizován až v 60 % přítomností zlomu v genu *PLAG1* a ve 30 % zlomu v genu *HMGA2* (35, 36). Fúze zaujímající jeden z těchto dvou genů, se tedy vyskytuje ve více jak 90 % PA a stejně tak i v karcinomech, vznikají maligní transformací PA (35, 36). V našem souboru převládá alterace v *HMGA2* genu, protože jsme aktivně vyhledávali a molekulárně-geneticky vyšetřovali PAs s kanalikulární morfologií, které preferenčně vykazují fúzi *HMGA2-WIF1* (37).

Molekulární mechanismus aktivace „*zinc finger*“ transkripčního faktoru *PLAG1* (chromozóm 8q12.1) spočívá v záměně promotoru mezi genem *PLAG1* a konstitutivně exprimovaným fúzním partnerem, tzv. „*promoter swapping*“ (38). Gen *PLAG1* je v tomto směru extrémně promiskuitní a fúzuje s řadou různých genů jako je *CHCHD7*, *CTNNB1*, *FGFR1*, *LIFR* a řadou dalších (33).

Oproti tomu aktivace proteinu HMGA2 (chromozóm 12q14.3) je nejvíce podobná aktivaci proteinu MYB v AdCC, kdy obdobně jako u genu *MYB* dochází u genu *HMGA2*, který náleží do „*non-histone chromosomal high mobility group*“ proteinové rodiny, k fúzi, jež způsobí ztrátu negativně regulačních oblastí microRNA v 3'UTR, v tomto případě oblasti pro microRNA *let7*. Tato ztráta pak vede k overexpresi proteinu HMGA2 a k nádorové transformaci (33).

V rámci této studie byly u PA nalezeny dosud nepopsané fúze genu *PLAG1* a *HMGA2*, konkrétně *MALAT1-PLAG1* a *HMGA2-FLJ41278*.

Gen *MALAT1*, lokalizovaný na chromozómu 11q13.1, kóduje „*long noncoding*“ RNA o délce cca 8700 bází, jež se pravděpodobně účastní tvorby ribonukleových komplexů a která je vysoce exprimovaná v řadě tkání (39). Molekulární mechanismus aktivace genu *PLAG1*, kdy je spojen vysoce exprimovaný gen *MALAT1* s téměř kompletním genem *PLAG1* (Obrázek 6), tedy s vysokou pravděpodobností souvisí s výše zmíněným procesem „*promoter swappingu*“ a může být považován za „*driver*“ mutaci vedoucí k nádorové transformaci.

Gen *FLJ41278* kóduje long intergenic non-protein coding RNA. V případě fúze *HMGA2-FLJ41278* (Obrázek 6) pak velmi pravděpodobně dochází v souladu s kanonickou aktivací *HMGA2* zmíněnou výše k odstranění 3'UTR regulačních oblastí a tím overexpresi *HMGA2* a následné nádorové transformaci.

Fúze genu *PLAG1* byla confirmována pomocí FISH. Ne tak *HMGA2*, neboť se jedná o inverzi dvou blízkých genů na chromozómu 12 vzdálených cca 1Mb což je pod rozlišovací schopnosti interfázni FISH.

Vedle tzv. „*driver*“ alterací zahrnujících geny *PLAG1* a *HMGA2* byla u jednoho případu myoepiteliálního karcinomu nesoucího „*driver*“ fúzi *CHCHD7-PLAG1* nalezena i fúze *FUS-GIPR*. Gen *FUS* (chromozóm 16p11.2) je stejně jako gen *EWSR1* členem rodiny TET(FET) proteinů (31, 32). Gen *GIPR* (chromozóm 19q13.32) kóduje „*G-protein coupled*“ receptor pro glukóza-dependentní insulinotropní polypeptid (GIP) (40). Jakým způsobem tato fúze přispívá, pokud vůbec, k neoplastické transformaci či progresi nádoru je nejasné a nejspíše se jedná o tzv. „*passenger*“ alteraci.

Nejčastějším maligním nádorem slinných žláz je mukoepidermoidní karcinom (MEC). MEC vychází z příušní žlázy a malých slinných žlázek sliznice patra a bukální

sliznice a je nejčastější intraorální salivární malignitou. Histologicky se MEC skládá ze třech typů buněk; epidermoidních, mucinózních a intermediárních a fúze genů *CRTC1* a *CRTC3* s genem *MAML2* je jeho typickým znakem.

Proteiny kódované geny *CRTC1* a *CRTC3* náleží do rodiny vysoce konzervovaných *CREB* (cAMP response element-binding) koaktivátorů. *CRTC1* a *CRTC3* zvyšuje transkripci z CRE (cAMP response element) prostřednictvím interakce s bZIP (bazický leucinový zip) doménou CREB (41). Produkt genu *MAML2* je transkripční koaktivátor v Notch signální dráze. Protein MAML2 tvoří komplex s intracelulární doménou proteinu Notch a s proteiny CSL-rodiny transkripčních faktorů. Tato interakce vede k aktivaci Notch downstream genů. U fúzního proteinu *CRTC1/3-MAML2* je nahrazena N-terminální (Notch vazebná) bazická doména genu *MAML2* CREB-binding doménou genu *CRTC1/3*. Molekulární konsekvence této záměny nejsou dosud zcela objasněné, ale z dosavadních zjištění vyplývá, že fúzní protein nezávisle na vstupních signálech aktivuje jak CREB závislé geny, tak i Notch signální dráhu. Aktivace dvou nezávislých drah pak zřejmě významně přispívá k vlastnímu neoplastickému procesu (41).

Intraduktální karcinom (IC) je nízcí maligní, zpravidla intraduktálně či intracysticky rostoucí karcinom, který je téměř v polovině (47 %) případů charakterizován zlomem genu *RET* a fúzním transkriptem *NCOA4-RET* v klasické variante IC a *TRIM27-RET* v nádorech s apokrinní diferenciací (42). Vzácně se mohou vyskytovat i další fúze jako např. *KIAA1217-RET*, *TUT1-ETV5* a *IRF2BP2-NTRK1* (42).

Sekreční karcinom (SC), původně popsáný jako sekreční karcinom mamárního typu (mammary analogue secretory carcinoma; MASC) (13) je low-grade salivární karcinom, který v naprosté většině případů vykazuje přítomnost fúzních transkriptů *ETV6-NTRK3* (13) a *ETV6-RET* (43). Zcela výjimečný je výskyt *VIM-RET* genové fúze, která byla nalezena zatím v jediném případě SC (44).

Molekulární podstata nádorové transformace u tumorů nesoucí fúzi genu *RET* a genů *NTRK* rodiny je poměrně jednoduchá. Gen *RET* a geny *NTRK* rodiny, tj. *NTRK1*, 2 a 3 kódují receptor tyrosin kinázy (RTK), jež hrají úlohu v řadě signálních drah účastnících se buněčného růstu a proliferace. K aktivaci „downstream“ signálních drah po rearanži zahrnující tyto kinázové geny může docházet několika mechanismy či spíše jejich souhrou. Jednak jsou v důsledku nahrazení „5'-upstream“ oblastí partnerskými geny a při zachování kinázových domén tyto konstitutivně exprimovány, dále dochází k di/oligomerizaci díky

protein-proteinovým interakcím 5' fúzních genů a také dochází ke ztrátě autoinhibiční N-terminální oblasti (45, 46).

Kromě genů fúzních transkriptů zahrnujících geny RET a NTRK1 byla u IC v jednom případě nalezena i fúze *TUT1-ETV5*. Tato fúze je atypická a vymyká se principu aktivace dalších onkogenů u této nádorové jednotky. Dochází při ní ke spojení široce exprimovaného proteinu TUT1 s nuklotidyl transferázovou aktivitou s proteinem z rodiny ETS transkripčních faktorů (47, 48). Právě zvýšená exprese transkripčního faktoru ETV5 pod promotorem *TET1* genu pak může stát za vlastní nádorovou transformací (49).

Vedle výše zmíněných nádorových jednotek byl analyzován jeden případ benigního onkocytomu, u kterého byla nalezena dosud nepopsaná fúze *FUS-PPARG* (Obrázek 6) a dále morfologicky zcela neznámý tumor s fúzí *EWSRI-NACCI*.

Onkocytom je benigní nádor sestávající z velkých epiteliálních buněk s hojnou eosinofilní granulární cytoplasmou naplněnou zmnoženými abnormálními mitochondriemi. Gen *FUS*, jak již bylo zmíněno výše, náleží do rodiny *TET(FET)* multifunkčních proteinů. (31, 32) Gen *PPARG*, lokalizovaný na chromozómu 3p25.2, pak kóduje jaderný hormonální receptor, který se po heterodimerizaci s retinoid X receptorem alfa váže na „*PPAR response*“ elementy v promoterech a enhancerech řady genů a aktivuje tak kaskádu regulující zejména vývoj adipocytů (50, 51). Gen *PPARG* byl nalezen v některých onkogenních fúzích. Např. fúze *PAX8-PPARG* se vyskytuje v 35 % folikulárních karcinomů štítné žlázy (FTC), fúze *CREB3L2-PPARG* pak v přibližně 3 % FTC. Molekulární konsekvence takovýchto fúzí nejsou zcela objasněné. K nádorové transformaci přispívají minimálně dvěma procesy. Jednak působí jako negativní inhibitor *PPARG* genu a jednak jako nový transkripční faktor s proto-onkogenní aktivitou pod konstitutivně aktivovaným promotorem 5' fúzního genu. (50, 51). Těmito způsoby pravděpodobně působí i nalezený fúzní protein *FUS-PPARG*.

Druhým tumorem zařazeným do části varia byl, jak je zmíněno výše, tumor s fúzí *EWSRI-NACCI*. Z morfologického hlediska jde o nejasný neopouzdržený monofazický epitelový tumor malé slinné žlázy dutiny ústní u 67-leté ženy. Nádor s onkocytární morfologií je nezařaditelný do žádné ze známých kategorií salivárních nádorů dle současné platné klasifikace WHO. V roce 2021 sice Antonescu et al. (52) publikovala skupinu 3 nádorů s fúzí *EWSRI-NACCI* a *FUS-NACCI*, nicméně tyto se od studovaného morfologicky liší a je tedy otázkou, zda jde v našem případě o zcela novou nádorovou jednotku s překrývajícím se molekulárním profilem. Gen *EWSRI* byl zmíněn výše. Gen

NACCI lokalizovaný na chromozomu 19p13.13 kóduje protein z BTB/POZ (bric-abrac tramtrack Broad complex/poxvirus and zinc finger) rodiny, který se účastní proliferace, apoptózy a transkripce (52). Konstitutivní exprese *NACCI* pod promotorem *EWSRI* genu jak pak nejpravděpodobnějším procesem vedoucím k nádorové transformaci.

8. Závěry

Tumory slinných žláz jsou relativně vzácná nádorová onemocnění. Jednotlivé nádorové jednotky jsou pak často jsou pak charakterizovány jednou či několika málo molekulárními aberacemi. V mé práci jsem analyzoval 135 tumorů vybraných skupin nádorů slinných žláz a definoval jejich specifické fúzní transkripty. Tyto fúzní transkripty byly nalezeny ve 109 případech (80,5 %).

V rámci mé bakalářské práce byly vedle klasických molekulárních aberací objeveny i 3 dosud nepopsané fúzní transkripty. Konkrétně byl nalezen a charakterizován fúzní transkript *MALAT1-PLAG1* a *HMGA2-FLJ41278* u pleomorfního adenomu a fúzní transkript *FUS-PPARG* u onkocytomu. Tyto fúze rozšiřují spektrum aberací charakterizujících specifické nádorové jednotky a tím umožňují budoucí přesnější klasifikaci, případně, poté, co budou dále zkoumány, i prognózu a predikci onemocnění nesoucí tyto aberantní transkripty.

Seznam použité literatury

1. Zámečník, Josef, ed. *Patologie*. Svazek 1. Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.
2. International Agency for Research. *Global Cancer Observatory* [online]. c2019. Dostupné z: <https://gco.iarc.fr/>.
3. Lee SC. *Medscape Pathology & Lab Medicine* [online]. c2017. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/852373-overview>.
4. Baloch Z, Field AS. Chapter 1. In: Faquin W, Rossi ED, editors: *The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology*. London: Springer, 2018, pp 1-8. ISBN 978-3-319-71285-7.
5. World Health Organisation classification of head and neck tumours. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg P, eds. *Tumours of the salivary glands*. 4th edition. Lyon IARC press, 2017; 159-202 [Chapter 7].
6. Malek SN, Hatfield AJ, Flinn IW. MALT Lymphomas. *Curr Treat Options Oncol*. 2003 Aug;4(4):269-79. doi: 10.1007/s11864-003-0002-2. PMID: 12943607.
7. Seifert G, Hennings K, Caselitz J. Metastatic tumors to the parotid and submandibular glands- analysis and differential diagnosis of 108 cases. *Pathol Res Pract*. 1986; 181:684-692.
8. Song IH, Song JS, Sung CO, Roh JL, Choi SH, Nam SY, et al. Accuracy of Core Needle Biopsy Versus Fine Needle Aspiration Cytology for Diagnosing Salivary Gland Tumors. *J Pathol Transl Med*. 2015 Mar;49(2):136-43.
9. Faquin W, Rossi ED, (Eds): *The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology*. 1st edition. London: Springer, 2018. ISBN 978-3-319-71285-7.
10. World Health Organisation classification of head and neck tumours. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg P, eds. *Tumours of the salivary glands*. 4th edition. Lyon IARC press, 2017; 159-202 [Chapter 7].
11. Seethala RR, Altemani A, Ferris RL, Fonseca I, Gnepp DR, Ha P, Nagao T, Skalova A, Stenman G, Thompson LDR. Data Set for the Reporting of Carcinomas of the Major Salivary Glands: Explanations and Recommendations of the Guidelines From the International Collaboration on Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med*. 2019 May;143(5):578-586. doi: 10.5858/arpa.2018-0422-SA. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30500293.

12. Griffith CC, Thompson LD, Assaad A, et al. Salivary duct carcinoma and the concept of early carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Histopathology*. 2014; 65(6):854–860
13. Skálová A, Vanecek T, Sima R, Laco J, Weinreb I, Perez-Ordóñez B, Starek I, Geierova M, Simpson RH, Passador-Santos F, Ryska A, Leivo I, Kinkor Z, Michal M. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34(5):599-608.
14. Behboudi A, Enlund F, Winnes M, et al. Molecular classification of mucoepidermoid carcinoma – prognostic significance of the MECT1-MAML2 fusion oncogene. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:470-481.
15. Drilon A, Li G, Dogan S, Gounder M, Shen R, Arcila M, et al. What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after ETV6-NTRK3 identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Ann Oncol*. 2016; 27(5):920-6.
16. Ferrarotto R, Mitani Y, Diao L, Guijarro I, Wang J, Zweidler-McKay P, et al. Activating *NOTCH1* Mutations Define a Distinct Subgroup of Patients With Adenoid Cystic Carcinoma Who Have Poor Prognosis, Propensity to Bone and Liver Metastasis, and Potential Responsiveness to Notch1 Inhibitors. *J Clin Oncol*. 2017 20;35(3):352-360.
17. Limaye SA, Posner MR, Krane JF, Fonfria M, Lorch JH, Dillon DA, et al. Trastuzumab for the treatment of salivary duct carcinoma. *Oncologist*. 2013;18(3):294-300.
18. Skálová A, Stenman G, Simpson RHW, Hellquist H, Slouka D, Svoboda T, et al. The Role of Molecular Testing in the Differential Diagnosis of Salivary Gland Carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2018; 42(2):e11-e27.
19. Simpson RWH, Skálová A, Di Palma S, Leivo I. Recent advances in the diagnostic pathology of salivary carcinomas. *Virchows Arch* 2014;465(4):371-84.
20. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 9). <https://publications.iarc.fr/>

21. Andreassen S, Kiss K, Mikkelsen LH, Channir HI, Plaschke CC, Melchior LC, et al. An update on head and neck cancer: new entities and their histopathology, molecular background, treatment, and outcome. *APMIS*. 2019;127(5):240-264.
22. Mrhalová M, Kodet R. Fluorescenční in situ hybridizace na histologických řezech [Fluorescence in situ hybridization on histologic sections]. *Cesk Patol*. 2013 Oct;49(4):114-22. Czech. PMID: 24289480.
23. Pfeifer JD (2006). *Molecular genetic testing in surgical pathology*. Lippincott, Williams & Wilkins.
24. Zámečník, Josef, ed. *Patologie*. Svazek 3. Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.
25. Froňková E. Sekvenování nové generace [Next-generation sequencing]. *Cesk Patol*. 2013 Jun;49(3):129-32. Czech. PMID: 23964910.
26. Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of *MYB* and *NFIB* transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3;106(44):18740-4.
27. Mitany Y, Li J, Rao PH, Zao YJ, Bell D, Lippman SM, et al. Comprehensive analysis of the *MYB-NFIB* gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: Incidence, variability, and clinicopathologic significance. *Clin Cancer Res* 2010; 16(19):4722-31.
28. Stenman G, Andersson MK, Andrén Y. New tricks from an old oncogene: gene fusion and copy number alterations of *MYB* in human cancer. *Cell Cycle*. 2010 Aug 1;9(15):2986-95.
29. Antonescu CR, Katabi N, Zhang L, Sung YS, Seethala RR, Jordan RC, et al. *EWSR1-ATF1* fusion is a novel and consistent finding in hyalinizing clear-cell carcinoma of salivary gland. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50(7):559-70.
30. Chapman E, Skalova A, Ptakova N, Martinek P, Goytain A, Tucker T, Xiong W, Leader M, Kudlow BA, Haimes JD, Hayes MM, Bohus P, Miesbauerova M, Lee CH, Ng TL. Molecular Profiling of Hyalinizing Clear Cell Carcinomas Revealed a Subset of Tumors Harboring a Novel *EWSR1-CREM* Fusion: Report of 3 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2018 Sep;42(9):1182-1189.
31. Tan AY, Manley JL. The TET family of proteins: functions and roles in disease. *J Mol Cell Biol*. 2009 Dec;1(2):82-92.
32. Lee J, Nguyen PT, Shim HS, Hyeon SJ, Im H, Choi MH, Chung S, Kowall NW, Lee SB, Ryu H. *EWSR1*, a multifunctional protein, regulates cellular function and aging via

- genetic and epigenetic pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019 Jul 1;1865(7):1938-1945.
33. Kumar-Sinha C, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM. Landscape of gene fusions in epithelial cancers: seq and ye shall find. *Genome Med.* 2015 Dec 18;7:129.
 34. Skálová A, Agaimy A, Vanecek T, Baněčková M, Laco J, Ptáková N, Šteiner P, Majewska H, Biernat W, Corcione L, Eis V, Koshyk O, **Vondrák J Jr**, Michal M, Leivo I. Molecular Profiling of Clear Cell Myoepithelial Carcinoma of Salivary Glands With EWSR1 Rearrangement Identifies Frequent *PLAG1* Gene Fusions But No *EWSR1* Fusion Transcripts. *Am J Surg Pathol.* 2021;45(1):1-13.
 35. Matsuyama A, Hisaoka M, Nagao Y, Hashimoto H. Aberrant *PLAG1* expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland: a molecular genetic and immunohistochemical study. *Virchows Arch* 2011;458(5):583-92.
 36. Katabi N, Ghossein R, Ho A, Dogan S, Zhang L, Sung YS, Antonescu CR. Consistent *PLAG1* and *HMGA2* abnormalities distinguish carcinoma ex-pleomorphic adenoma from its de novo counterparts. *Hum Pathol.* 2015;46(1):26-33.
 37. Chiosea SI, Thompson LD, Weinreb I, Bauman JE, Mahaffey AM, Miller C, Ferris RL, Gooding WE. Subsets of salivary duct carcinoma defined by morphologic evidence of pleomorphic adenoma, *PLAG1* or *HMGA2* rearrangements, and common genetic alterations. *Cancer* 2016;122(20):3136-3144.
 38. Aström AK, Voz ML, Kas K, Röijer E, Wedell B, Mandahl N, Van de Ven W, Mark J, Stenman G. Conserved mechanism of *PLAG1* activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of *SII* as a new fusion partner gene. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):918-23. PMID: 10029085.
 39. Spans L, Fletcher CD, Antonescu CR, Rouquette A, Coindre JM, Sciot R, Debiec-Rychter M. Recurrent *MALAT1-GLI1* oncogenic fusion and *GLI1* up-regulation define a subset of plexiform fibromyxoma. *J Pathol.* 2016 Jul;239(3):335-43. doi: 10.1002/path.4730. Epub 2016 May 20. PMID: 27101025; PMCID: PMC5586099.
 40. Costa MH, Latronico AC, Martin RM, Barbosa AS, Almeida MQ, Lotfi CF, Valassi HP, Nishi MY, Lucon AM, Siqueira SA, Zerbini MC, Carvalho LR, Mendonca BB, Frago MC. Expression profiles of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor and *LHCGR* in sporadic adrenocortical tumors. *J Endocrinol.* 2009 Feb;200(2):167-75. doi: 10.1677/JOE-08-0395. Epub 2008 Oct 29. PMID: 18971217.
 41. Clark MD, Kumar GS, Marcum R, Luo Q, Zhang Y, Radhakrishnan I. Molecular Basis for the Mechanism of Constitutive CBP/p300 Coactivator Recruitment by *CRTC1*-

- MAML2 and Its Implications in cAMP Signaling. *Biochemistry*. 2015 Sep 8;54(35):5439-46. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00332. Epub 2015 Aug 21. PMID: 26274502; PMCID: PMC4564341.
42. Skálová A, Vanecek T, Uro-Coste E, Bishop JA, Weinreb I, Thompson LDR, de Sanctis S, Schiavo-Lena M, Laco J, Badoual C, Santana Conceição T, Ptáková N, Baněčkova M, Miesbauerová M, Michal M. Molecular Profiling of Salivary Gland Intraductal Carcinoma Revealed a Subset of Tumors Harboring *NCOA4-RET* and Novel *TRIM27-RET* Fusions: A Report of 17 cases. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(11):1445-1455.
 43. Skalova A, Vanecek T, Martinek P, Weinreb I, Stevens TM, Simpson RHW, Hycrza M, Rupp NJ, Baneckova M, Michal M Jr, Slouka D, Svoboda T, Metelkova A, Etebarian A, Pavelka J, Potts SJ, Christiansen J, Steiner P, Michal M. Molecular Profiling of Mammary Analog Secretory Carcinoma Revealed a Subset of Tumors Harboring a Novel ETV6-RET Translocation: Report of 10 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(2):234-246.
 44. Skálová A, Banečkova M, Thompson LDR, Ptáková N, Stevens TM, Brcic L, Hycrza M, Michal M Jr, Simpson RHW, Santana T, Michal M, Vaněček T, Leivo I. Expanding the Molecular Spectrum of Secretory Carcinoma of Salivary Glands With a Novel *VIM-RET* Fusion. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(10):1295-1307.
 45. Santoro M, Moccia M, Federico G, Carlomagno F. RET Gene Fusions in Malignancies of the Thyroid and Other Tissues. *Genes (Basel)*. 2020 Apr 15;11(4):424. doi: 10.3390/genes11040424. PMID: 32326537; PMCID: PMC7230609.
 46. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Dec;15(12):731-747. doi: 10.1038/s41571-018-0113-0. PMID: 30333516; PMCID: PMC6419506.
 47. Knouf EC, Wyman SK, Tewari M. The human TUT1 nucleotidyl transferase as a global regulator of microRNA abundance. *PLoS One*. 2013 Jul 18;8(7):e69630. doi: 10.1371/journal.pone.0069630. PMID: 23874977; PMCID: PMC3715485.
 48. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Nov;2(11):827-37. doi: 10.1038/35099076. PMID: 11715049.
 49. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR, Cao X, Singla N, Montie JE, Varambally S, Mehra R, Chinnaiyan AM. Characterization of *TMPRSS2:ETV5* and *SLC45A3:ETV5* gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 Jan 1;68(1):73-80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5352. PMID: 18172298.

50. Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Feb 26;12:624112. doi: 10.3389/fendo.2021.624112. PMID: 33716977; PMCID: PMC7953066.
51. Raman P, Koenig RJ. Pax-8-PPAR- γ fusion protein in thyroid carcinoma. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Oct;10(10):616-23. doi: 10.1038/nrendo.2014.115. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25069464; PMCID: PMC4290886.
52. Antonescu, C.R., Dickson, B.C., Zhang, L. *et al*. Unclassified low grade spindle cell sarcoma with storiform pattern characterized by recurrent novel *EWSR1/FUS-NACCI* fusions. *Mod Pathol* 34, 1541–1546 (2021).