

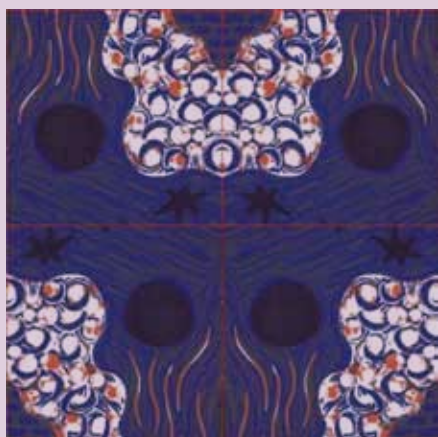
PROGRAMME AND ABSTRACT BOOK



The 9th Symposium & Workshop
on Molecular Pathology
and Histo(cyto)chemistry

The 99th Olomouc Seminar
of the Czech Division
of the International Academy
of Pathology

The 5th Olomouc Days
of Histology Laboratory Technicians



ORGANIZED BY

- The Czech Society of Pathologists CLS JEP
- Molecular Pathology Working Group (Czech Society of Pathologists and European Society of Pathology)
- The Czech Division of the International Academy of Pathology
- The Czech Oncological Society CLS JEP
- The Czech Society for Histochemistry and Cytochemistry
- The Czech Society of Laboratory Technicians
- The Department of Clinical and Molecular Pathology and Laboratory of Molecular Pathology
- The Institute of Molecular and Translation Medicine
- Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc and University Hospital Olomouc

**APRIL 26TH–27TH, 2013
OLOMOUC**

THE CZECH REPUBLIC

ISBN 978-80-7471-022-3



High Pure FFPET RNA Isolation Kit

Easy RNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples

Maximize yields of total RNA from your valuable formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples using the **High Pure FFPET RNA Isolation Kit**.

Streamline your workflow by easily isolating the RNA in your important FFPE research samples when analyzing disease progression, compound responsiveness, and toxicology.

Enjoy the following benefits of the High Pure FFPET RNA Isolation Kit:

- Isolate RNA in just 2.5 hours, including deparaffinization.
- Obtain high RNA yield and quality
- Produce powerful signals downstream using RT-qPCR and gene expression arrays.

Vyžádejte si u nás vzorek High Pure FFPET RNA Isolation Kit na testování zdarma ještě dnes.



Roche s.r.o.
Diagnostická divize
Karlovo náměstí 17
120 00 Praha 2
email: czech.appliedscience@roche.com

The 9th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry
 The 99th Olomouc Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology
 The 5th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians

April 26th – 27th, 2013, Olomouc, Czech Republic

Under the auspices of

- prof. M. Mašláň, Ph.D. / Rector of Palacký University, Olomouc
- prof. M. Kolář, M.D., Ph.D. / Dean of the Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc
- R. Havlík, M.D., Ph.D. / Director of the University Hospital Olomouc

Organized by:

The Department of Clinical and Molecular Pathology & the Laboratory of Molecular Pathology & the Institute of Molecular and Translation Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

Chairman of the Congress:

prof. Zdeněk Kolář, M.D., Ph.D. / The Department of Clinical and Molecular Pathology & the Laboratory of Molecular Pathology
 Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Hněvotínská 3, Olomouc, 775 15
 Tel: +420/585 632 451; Fax: +420/585 632 966; e-mail: kolarz@tunw.upol.cz

Organizing & Programme Committee:

Prof. Jiří Ehrmann, M.D., Ph.D.; Assoc. prof. Marián Hajdúch, M.D., Ph.D.; Prof. Zdeněk Kolář, M.D., Ph.D.;
 Prof. Jaroslav Mokřý, M.D., Ph.D.; Assoc. prof. Martin Tichý, M.D., Ph.D.; Danuše Kvapilová; Jana Steigerová, MSc., Ph.D.

Venue:

Friday, April 26th – Regional Centre Olomouc (Jeremenkova 40B, Olomouc, 772 00)
 Saturday, April 27th – Theoretical Institutes Building, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc
 (Hněvotínská 3, Olomouc, 775 15)

Conference Language:

The 9th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry – English and Czech
 The 99th Olomouc Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology – Czech
 The 5th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians – Czech

The 9th Symposium on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry

FRIDAY, APRIL 26TH, 2013

8.30–9.00	Registration	
9.00–9.15	Joint meeting ceremony (Z. Kolář, J. Ehrmann, D. Kvapilová, M. Mašláň, M. Kolář, M. Hajdúch, R. Havlík)	Regional Centre Centaurus Hall / English
Keynote lectures of invited speakers I. Chairs: G. Stanta (Trieste), Z. Kolář (Olomouc)		
9.15–9.45	G. Stanta (Trieste) Tissue micro-environment in molecular pathology	Regional Centre Centaurus Hall / English
9.45–10.15	J. Bártek (Copenhagen, Olomouc) Interplay of tissue microenvironment and cellular DNA damage response machinery in genome (in) stability and senescence in inflammation and cancer	Regional Centre Centaurus Hall / English
10.15–10.45	O. Cuvillier (Toulouse) Hypoxia in prostate cancer	Regional Centre Centaurus Hall / English
10.45–11.15	Coffee break (Foyer RCO)	
Keynote lectures of invited speakers II. Chairs: K. Smetana (Praha), J. Mokry (Hradec Králové)		
11.15–11.45	K. Smetana (Praha) Cancer stromal fibroblasts: biology and possibilities of therapeutic manipulation	Regional Centre Centaurus Hall / English
11.45–12.15	H. Erb (Innsbruck) Interleukins 4 and 6 in Prostate Cancer progression	Regional Centre Centaurus Hall / English
12.15–12.45	K. Dev (Hradec Králové) Amniotic fluid stem cells and their clinical implication	Regional Centre Centaurus Hall / English
12.45–13.15	J. Hejnar (Praha) Increased expression of Tet-1 associated with 5-methylcytosine hydroxylation in seminoma	Regional Centre Centaurus Hall / English
13.15–13.45	Lunch break (Foyer RCO) Poster Session (Author presentations at 13:30)	
Keynote lectures of invited speakers III. Chairs: J. Ehrmann (Olomouc), O. Slabý (Brno)		
13.45–14.00	M. Jirkovská (Praha) Maternal diabetes influences proliferative potential and cell differentiation in fetoplacental capillaries	Regional Centre Centaurus Hall / Czech
14.00–14.15	O. Slabý (Brno) MicroRNAs in solid cancer: from biomarkers to therapeutic targets	Regional Centre Centaurus Hall / Czech
14.15–14.30	M. Petřek (Olomouc) Expression of eight candidate miRNAs in aortic valves from patients with aortal stenosis	Regional Centre Centaurus Hall / Czech
14.30–14.45	J. Nekvindová (Olomouc, Hradec Králové) CYP2W1 in colorectal cancer	Regional Centre Centaurus Hall / Czech
14.45–15.00	P. Locatelli (Soriso) Collection, transfer and storage of biospecimens: innovative solutions	Regional Centre Centaurus Hall / English
15.00–15.15	Coffee break (Foyer RCO)	

Společnost Lineq se specializuje na prodej a servis v oblasti kryogenních aplikací.



Lineq nabízí:

- Dewarovy nádoby Taylor-Wharton HARSCO
- **dodávky kapalného dusíku**
- různé vestavby a příslušenství k Dewarovým nádobám
- programovatelné zamrazovače Sy-Lab
- projekci, realizaci a údržbu kryobank
- transport vzorků v kapalném dusíku (LIN) nebo jeho parách
- zapůjčení Dewarových nádob a zásobníků LIN
- skladování vzorků v LIN nebo jeho parách
- zálohování vzorků při poruchách
- monitorování Dewarových nádob a prostoru kryoskladu

Lineq, s.r.o., V Horce 178, 252 28 Černošice
tel./fax: +420 251 642 390, mobil: +420 724 115 290
e-mail: lineq@lineq.cz

www.lineq.cz



Profesionální dlouhodobé skladování buněk a tkání v kapalném dusíku.

KRYO je tkáňovým zařízením podle zákona 296/2008 Sb.



KRYO s.r.o.
Průmyslová 2053
594 01 Velké Meziříčí

mobil: +420 724 115 290
tel./fax: +420 566 520 795
e-mail: kryo@kryo.cz

www.kryo.cz

Selected oral presentations

Chairs: J. Bouchal (Olomouc), J. Steigerová (Olomouc)

15.15–15.30	I. Blanárik (Praha) Cobas® PIK3CA mutation test in practical training	Regional Centre Centaurus Hall / Czech
15.30–15.45	A. Hyršlová Vaculová (Brno) Platinum-based chemotherapeutic drugs as effective sensitizers of colon and prostate cancer cells to the apoptotic action of TRAIL	Regional Centre Centaurus Hall / Czech
15.45–16.00	P. Flodr (Olomouc) Epstein-Barr Virus and Lymphomagenesis	Regional Centre Centaurus Hall / Czech
16.00–16.15	J. Berkovcová (Brno) Secondary mutations in C-KIT in GIST occurring after therapy with imatinib	Regional Centre Centaurus Hall / Czech
16.15–16.30	Final Panel Discussion	Regional Centre Centaurus Hall / Czech

POSTERS (AUTHOR PRESENTATIONS AT 13:30)

REGIONAL CENTRE CASSIOPEIA HALL / ENGLISH, CZECH

1 **Přehled primárních a sekundárních mutací s ohledem na význam detekce primární a sekundární rezistence u pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem**

Augustiňáková A., Hilská I., Krsková L., Kalinová M., Břízová H., Fejfarová J., Šmídová O., Forejtová V., Kodet R.
Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN v Motole

2 **Specific conditions of tumor microenvironment enhance cytotoxicity of disulfiram, tetrathiomolybdate and wedelolactone to breast cancer and neuroblastoma cells**

Beneš P.^{1,2}, Navrátilová J.¹, Hankeová T.¹, Nehybová T.¹, Knopfová L.^{1,2}, Šmarda J.^{1,2}

¹Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Masaryk Memorial Cancer Institute, RECAMO, Brno, Czech Republic

3 **Imunohistochemická analýza exprese proteinu AGR3 a mukopolysacharidů u cholangiocelulárního a hepatocelulárního karcinomu**

Brychtová V.¹, Žampachová V.², Hrstka R.¹, Němeček R.³, Fabian P.⁴, Hermanová M.², Vojtěšek B.¹

¹RECAMO, Masarykův onkologický ústav, Brno

²I. patologicko-anatomický ústav, LF MU a FN u sv. Anny v Brně

³Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴Oddělení patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

4 **Spatio-temporal distribution of CYP P450 Epoxygenases in human embryos: importance for prenatal development**

Čížková K.

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

5 **Rôzna úroveň exprese proteínu CA IX a intenzity signálu CA9 génu v medulárnom karcinóme štítnej žľazy s ohľadom na prognózu pacienta**

Feketeová L.¹, Janega P.^{1,2}, Babál P.¹

¹Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská republika

²Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

6 **Detekcia mutácií BRAF génu vo wild type GISToch**

Gemzová K., Buzalková V., Minárik G., Plank L., Lasabová Z.

Ústav molekulovej biológie JLF UK a UNM, Vrútky, Kalinčiaka 2

7 **Detekcia MPL mutácií u JAK2 negatívnych pacientov**

Gemzová K., Burjanivová T., Marcinek J., Marlen Fossan Aas, Plank L., Lasabová Z.

Ústav molekulovej biológie JLF UK a UNM, Vrútky, Kalinčiaka 2

8 **Kostní dřeň-zkušenosti z pohledu laboratorního pracovníka**

Hrabovská L., Broklová I.

CGB laboratoř a.s., Ostrava

9 **Studium interakcí lidského prionového proteinu (PrPC) s kovy (Cu, Zn) a metalothioneinem**

Cardová A.¹, Šobrová P.¹, Vaculovičová M.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}, Adam A.^{1,2}

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita v Brně

²Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Brno

10 Microenvironment-dependent function of c-Myb in breast cancer: the focus on the tumor-endothelial cell interactions

Knopfová L.^{1,2}, Beneš P.^{1,2}, Hermanová M.³, Masařík M.⁴, Šmarda J.^{1,2}

¹Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

²Masaryk Memorial Cancer Institute, RECAMO, Brno, Czech Republic

³First Department of Pathological Anatomy, St. Anne's University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

11 Expresní analýza genů zapojených v patogenezi rhabdomyosarkomů

Krsková L., Mrhalová M., Hliská I., Fejfarová J., Šmídková O., Kodet R.

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF a FN Motol, Praha

12 Activated inflammatory cells in human atrial myocardium from patients with atrial fibrillation

Kučera T.¹, Smorodinova N.¹, Cohen-Addad D.¹, Ben-David Ch.¹, Přidal J.¹, Ďurišová M.¹, Bláha M.², Melenovský V.², Kautzner J.²

¹Institute of Histology and Embryology, The First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

²Institute for Clinical and Experimental Medicine- IKEM, Department of Cardiology, Prague, Czech Republic

13 Elastin in Human Atrial Wall During Atrial Fibrillation

Lantová L.¹, Smorodinova N.¹, Melenovský V.², Bláha M.², Kautzner J.², Kučera T.¹

¹Charles University in Prague, The First Faculty of Medicine, Institute of Histology and Embryology, Prague, Czech Republic

²Institute for Clinical and Experimental Medicine, The Cardiology Centre, Prague, Czech Republic

14 Rosiglitazone-mediated stimulation of LA-12-induced apoptosis is accompanied by changes in colon cancer cell cycle progression

Lauková J.^{1,2,3}, Hofmanová J.^{1,2}, Sova P.⁴, Straková N.^{1,5}, Hermann J.⁵, Kolář Z.⁶, Kozubík A.^{1,2}, Hyršlová Vaculová A.^{1,3}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic

²Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Center of Biomolecular and Cellular Engineering, International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital Brno, Czech Republic

⁴Platinum Pharmaceuticals, a.s., Brno, Czech Republic

⁵Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

⁶Institute of Clinical and Molecular Pathology, University Hospital, Olomouc, Czech Republic

15 Laser capture microdissection as a tool of molecular biology

Luzna P., Ehrmann J. Jr.

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc, Olomouc, Czech Republic

16 Srovnání molekulárně diagnostických metod pro detekci polymorfismů v genu TPMT

Pížová K.¹, Zaoralová R.¹, Kolorz M.², Bartošová L.², Uličná D.¹, Uličný B.¹

¹YBUX s.r.o., Brno, Česká republika

²Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, VFU Brno, Česká republika

17 Fibrosis and microvascular density in human atrial wall during atrial fibrillation

Smorodinova N.¹, Bláha M.², Martinek J.¹, Melenovský V.², Kautzner J.², Kučera T.¹

¹Institute of Histology and Embryology, The First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

²Institute for Clinical and Experimental Medicine- IKEM, Department of Cardiology, Prague, Czech Republic

18 Využití metody StripAssay k prediktivní detekci mutace B-raf v kodónech 600/601 u maligního melanomu

Staněk L., Dundr P., Jakša R., Lísová S., Ludvíková M.

Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

19 Dubin Johnsonův syndrom: koincidence s kolorektálním karcinomem a pokročilou aterosklerózou u 82letého pacienta

Sticová E., Elleder M., Hůlková H., Novotný J., Lukšan O., Jirsa M.

Laboratoř experimentální hepatologie CEM IKEM Praha

Ústav patologie 3.LF UK Praha

Ústav dědičných a metabolických poruch 1.LF UK a VFN Praha, Masarykova nemocnice o.z. Ústí nad Labem

20 Oxaliplatin with PPAR γ ligand modulate regulation of the cell cycle and cell death of colon tumors

Straková N.^{1,2,3}, Hofmanová J.^{1,2}, Souček K.^{1,4}, Fedr R.¹, Hyršlová Vaculová A.^{1,2}, Zapletal O.¹, Tylichová Z.^{1,2}, Lauková J.^{1,2}, Bouchal J.^{2,3}, Hermann J.^{2,3}, Kolář Z.^{2,3}, Kozubík A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Brno, Czech Republic

²Biomedical Centre of Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

³Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Czech Republic

⁴Center of Biomolecular and Cellular Engineering, International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

21 **Přehled gastrointestinálních stromálních tumorů diagnostikovaných na Ústavu patologie FN Ostrava v letech 2010 až 2012**

Tomanová R.¹, Dvořáčková J.¹, Mačák J.², Buzrla P.¹, Ehrmann J.^{3,5}, Brychtová S.^{3,5}, Krhutová V.⁴, Tavandzis S.⁴, Janíková M.⁵

¹Ústav patologie FN Ostrava

²LF OU Ostrava

³Ústav patologie FN Olomouc

⁴PaR LAB a.s. Nový Jičín

⁵LMP LF UP Olomouc

22 **Fosforylační stav E3-ubikvitin ligázy CHIP může ovlivňovat její vazbu k chaperonům HSP70/90**

Trčka F., Ďurech M., Miller P., Vojtěšek B.

Regionální Centrum Aplikované Molekulární Onkologie (RECAMO), Masarykův onkologický ústav, Brno

23 **Dietary lipids modulatory effects on colon cancer cells**

Tylichová Z.^{1,2}, Hofmanová J.^{1,2}, Straková N.¹, Hyršlová Vaculová A.¹, Kozubík A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

²Department of Animal Physiology and Immunology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Terezy Novákové 64, 621 00 Brno, Czech Republic

24 **An association of molecular genetic parameters in gliomas and meningiomas with histological type and grade**

Urbanovská I.^{1,2,3}, Konvalinka D.¹, Uvírová M.^{1,2,3}, Tomanová R.^{2,4}, Buzrla P.⁴, Marková D.¹, Paleček T.⁵, Dvořáčková J.^{2,4}, Drábek J.³

¹CGB laboratory Inc., Laboratory of molecular genetics and pathology, Ostrava, Czech Republic

²Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

³Faculty of Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

⁴University Hospital in Ostrava, Institute of Pathology

⁵University Hospital in Ostrava, Neurosurgery Clinic

25 **Sledování mikrovaskulární denzity u kožních melanomů a melanocytárních névů.**

Židlík V.¹, Brychtová S.³, Dvořáčková J.^{1,2}, Uvírová M.¹, Šustíková J.¹

¹CGB laboratoř a.s.

²FNO Ostrava

³Ústav patologie a laboratoř molekulární patologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc

26 **The relationship of selected miRNAs to P-glycoprotein, MRP1 and LRP/MVP mediated drug resistance in non-small cell lung cancer**

Zizkova V.¹, Janikova M.^{1,2}, Luzna P.², Skarda J.^{1,3}, Radova L.³, Kolec V.⁴, Kolar Z.^{1,3}

¹Department of Clinical and Molecular Pathology and Laboratory of Molecular Pathology,

²Department of Histology and Embryology,

³Institute of Molecular and Translational Medicine,

⁴Department of Tuberculosis and Respiratory Diseases,

⁵Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital, Hnevotinska 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

27 **Endocardial fibroelastosis in chick model of hypoplastic left heart syndrome**

Kvasilova A.¹, Pesevski Z.^{1, 2}, Stopkova T.¹, Sedmera D.^{1, 2}

¹Institute of Anatomy, Charles University, Prague, Czech Republic

²Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

28 **Expres fibroblastového růstového faktoru 2 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií**

Nekvindová J.¹, Vrbacký F.², Jirchová Z.¹, Řezáčová V.³, Šimkovi M.², Painuly U.², Malý J.², Palička V.¹, Smolej L.²

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové

²IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

³Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

SOCIAL PROGRAMME

18.00 Departure from the Regional Centre Olomouc (RCO) (bus transport guaranteed)

18.30–19.00 Welcome cocktail in Archa restaurant–Svatý Kopeček

19.00–20.00 Concert of F. Procházka (Jazz revival L. Armstrong) in Archa restaurant–Svatý Kopeček

20.00–24.00 Social evening in Archa restaurant–Svatý Kopeček (bus transport guaranteed)

Workshop on Molecular Pathology

Life Technologies: „Next generation sequencing in diagnostics“

SATURDAY, APRIL 27TH, 2013

Chairs: O. Holeňa (Praha), J. Steigerová (Olomouc)

Genetic analysis in the digital age

9.00–9.30	O. Holeňa (Praha) Ion Torrent Technology – next-gen semiconductor chip sequencing	Theoretical Institutes Building (2 nd floor, 2.517) Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc / Czech
9.30–10.00	A. Merta (Praha) QuantStudio™ a ViiA7™ – from Real-Time PCR analysis to the digital PCR and OpenArray® Technology from Life Technologies/Applied Biosystems	Theoretical Institutes Building (2 nd floor, 2.517) Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc / Czech
10.00–10.30	J. Polínek (Praha) VectorNTI – software for in silico-cloning and genetic analysis	Theoretical Institutes Building (2 nd floor, 2.517) Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc / Czech

10.30–11.00 Coffee break

Molecular biology ordering and how to simplify your experiments

11.00–11.30	J. Kopecká (Praha) GeneArt – Technology of DNA synthesis de novo – gene synthesis ordering	Theoretical Institutes Building (2 nd floor, 2.517) Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc / Czech
11.30–12.00	A. Merta (Praha) Technology TaqMan® – from single gene analysis to multigene studies by TaqMan® Array and OpenArray® cards: analysis of gene expression and microRNA, SNP genotyping, somatic mutation analysis (castPCR method), analysis of copy number variation (CNV)	Theoretical Institutes Building (2 nd floor, 2.517) Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc / Czech
12.00–12.30	O. Holeňa (Praha) AmpliSeq™ – next-gen sequencing of genes by your selection	Theoretical Institutes Building (2nd floor, 2.517) Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc / Czech
12.30–13.00	Discussion	Theoretical Institutes Building (2 nd floor, 2.517) Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc / Czech

99. olomoucký meziregionální mezioborový diagnostický seminář Společnosti českých patologů a české sekce International Academy of Pathology

PÁTEK, 26. DUBNA 2013

8.30–9.00 Registrace

9.00–9.15 **Slavnostní zahájení**

Regionální centrum
sál **Centaurus** / anglicky

Přednášky pozvaných hostů

Předsednictvo: G. Stanta (Trieste), Z. Kolář (Olomouc)

9.15–9.45 G. Stanta (Trieste)

Tissue micro-environment in molecular pathology

Regionální centrum
sál **Centaurus** / anglicky

9.45–10.15 J. Bártek (Copenhagen, Olomouc)

Interplay of tissue microenvironment and cellular DNA damage response machinery in genome (in) stability and senescence in inflammation and cancer

Regionální centrum
sál **Centaurus** / anglicky

10.15–10.45 O. Cuvillier (Toulouse)

Hypoxia in prostate cancer

Regionální centrum
sál **Centaurus** / anglicky

10.45–11.15 Přestávka (Foyer RCO)

Diagnostický seminář Společnosti českých patologů a české sekce International Academy of Pathology

Předsednictvo: M. Tichý (Olomouc), T. Tichý (Olomouc)

11.15–13.00 Diagnostický seminář – část I.

J. Dvořáčková (Praha)

EUS FNA on site cytologie pankreatu – pětileté zkušenosti

Regionální centrum
sál **Andromeda** / česky

13.00–13.45 Oběd (Foyer RCO)

Sekce posterů (s autory ve 13:30)

Diagnostický seminář Společnosti českých patologů a české sekce International Academy of Pathology

Předsednictvo: M. Tichý (Olomouc), T. Tichý (Olomouc)

13.45–15.45 Diagnostický seminář – část II.

Regionální centrum
sál **Andromeda** / česky

PŘÍPADY NA 99. DIAGNOSTICKÝ SEMINÁŘ IAP KONANÝ V RÁMCI 9. SYMPOZIA A WORKSHOPU MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE A HISTO(CYTO)CHEMIE

- CN 3281, H 3862/11**, 70letá pacientka se splenomegalií a hypersplenismem. Rok sledovaná pro sideropenii, zjištěna splenomegalie. Došetřena kompletně, včetně PET/CT, uzavřeno jako progredující splenomegalie a anémie, indikovaná k splenektomii. Byla dodána slezina hmotnosti 2400 g, vel. 230x175x75 mm, s lymfatickými uzlinami v hilu.
Referuje: **MUDr. M. Geierová**
- CN 3282, H 8253/12**, 63letý muž s krční, axilární a tříselnou lymfadenomegalií a mírnou hepatosplenomegalií. Byly dodány lymfatické uzliny z levé axily.
Referuje: **MUDr. J. Michálek**
- CN 3283, H 2375/12**, 43letá žena, kožní excize vel. 9x4x4 mm.
Referuje: **MUDr. P. Flodr**
- CN 3284, P 303/12**, 31letá pacientka s objemným tumorem v pravém hemithoraxu.
Referuje: **MUDr., MUDr. J. Škarda, Ph.D.**
- CN 3285, H 310/12**, 39letý muž s lymfadenopatií v pravé inguinální oblasti.
Referuje: **MUDr. P. Látalová**

- 6 **CN 3286, H 19050/11**, 55letá žena s febrilním stavem nejasné etiologie, generalizovanou lymfadenopatií, polyserozitidou, artralgií a generalizovaným exantémem. Provedena biopsie lymfatické uzliny k vyloučení lymfoproliferativního onemocnění.
Referuje: **Doc. MUDr. S. Brychtová, Ph.D.**
- 7 **CN 3287, P 274/12**, 36letý muž zemírá za klinických příznaků pravostranného srdečního selhání. Materiál: tkáň ze srdce.
Referuje: **MUDr. Z. Prouzová**
- 8 **CN 3288, H 17337/11**, 67letá žena s nádorem mediastinu v pravém kardiofrenickém úhlu vel. 5x7 cm. Provedena resekce nádoru s částí bránice a perikardu. Jiná nádorová ložiska nebyla prokázána.
Referuje: **MUDr. T. Tichý**
- 9 **CN 3289, H 9454/11**, 39letý muž s dg. neurofibromatózy, s nově diagnostikovaným objemným tumorem retroperitonea.
Referuje: **MUDr. D. Kurfürstová**
- 10 **CN 3290, H 22572/12**, 29letá žena s 3 měsíční anamnézou zvětšující se rezistence v oblasti hypothenaru levé ruky, palpačně mírně bolestivé, tuhé.
Referuje: **MUDr. J. Janková**
- 11 **CN 3291, H 20451/11**, 55letý, muž s přetrvávajícím kašlem a námahovou dušností, dle RTG a CT vyšetření nález plicní atelaktázy s tumorem v oblasti kmenového bronchu levé plíce. Provedena dolní bronchoplastická lobektomie s mediastinální lymfadenektomií.
Referuje: **MUDr. B. Krajsová**
- 12 **CN 3292, H 21875/10**, 65letý muž s intracerebelárním tumorem v oblasti vermis.
Referuje: **MUDr. L. Tučková**

SPOLEČENSKÝ PROGRAM

18.00	Odjezd od RCO (odvoz autobusy zajištěn)
18.30–19.00	Zahájení a přípitek, restaurace Archa na Sv. Kopečku
19.00–20.00	Koncert F. Procházky (Jazz revival L. Armstronga)
20.00–24.00	Společenský večer v restauraci Archa na Sv. Kopečku (odvoz autobusy zajištěn)

Workshop molekulární patologie

Life Technologies: „Nová generace sekvenování a jeho využití v diagnostice“

SOBOTA, 27. DUBNA 2013

Předsednictvo: O. Holeňa (Praha), J. Steigerová (Olomouc)

Genetická analýza v digitální éře

9.00–9.30	O. Holeňa (Praha) Ion Torrent technologie–next-gen sekvenování na polovodičových čipech	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
9.30–10.00	A. Merta (Praha) QuantStudio™ a ViiA7™ – od real-time PCR analýzy k digitální PCR a OpenArray® technologii od Life Technologies/Applied Biosystems	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
10.00–10.30	J. Polínek (Praha) VectorNTI–program pro in silico-klonování a zpracování dat genetické analýzy	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky

10.30–11.00 Přestávka

Molekulární biologie „na zakázku“ aneb jak si můžete zjednodušit své experimenty

11.00–11.30	J. Kopecká (Praha) GeneArt–Technologie syntézy DNA de novo–syntéza genů na zakázku	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
11.30–12.00	A. Merta (Praha) Technologie TaqMan® – od analýzy jednotlivých genů po multigenové studie pomocí TaqMan® Array a OpenArray® karet: analýza genové exprese a microRNA, genotypizace SNP, analýza somatických mutací (metoda castPCR), analýza počtu kopií genů (CNV)	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
12.00–12.30	O. Holeňa (Praha) AmpliSeq™ – next-gen sekvenování genů podle Vašeho výběru	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
12.30–13.00	Diskuze	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky

5. olomoucké dny histologických laborantů

PÁTEK, 26. DUBNA 2013

8.30–9.00	Registrace	
9.00–9.15	Slavnostní zahájení	Regionální centrum sál Centaurus / anglicky
Přednášky pozvaných hostů – část I Předsednictvo: G. Stanta (Trieste), Z. Kolář (Olomouc)		
09.15–09.45	G. Stanta (Trieste) Tissue micro-environment in molecular pathology	Regionální centrum sál Centaurus / anglicky
09.45–10.15	J. Bártek (Copenhagen, Olomouc) Interplay of tissue microenvironment and cellular DNA damage response machinery in genome (in) stability and senescence in inflammation and cancer	Regionální centrum sál Centaurus / anglicky
10.15–10.45	O. Cuvillier (Toulouse) Hypoxia in prostate cancer	Regionální centrum sál Centaurus / anglicky
10.45–11.15	Přestávka (Foyer RCO)	
Přednášky pozvaných hostů – část II Předsednictvo: K. Smetana (Praha), J. Mokřý (Hradec Králové)		
11.15–11.45	K. Smetana (Praha) Cancer stromal fibroblasts: biology and possibilities therapeutic manipulation	Regionální centrum sál Centaurus / anglicky
11.45–12.15	H. Erb (Innsbruck) Interleukins 4 and 6 in Prostate Cancer progression	Regionální centrum sál Centaurus / anglicky
12.15–12.45	K. Dev (Hradec Králové) Amniotic fluid stem cells and their clinical implication	Regionální centrum sál Centaurus / anglicky
12.45–13.15	J. Hejnar (Praha) Increased expression of Tet-1 associated with 5-methylcytosine hydroxylation in seminoma	Regionální centrum sál Centaurus / anglicky
13.15–13.45	Oběd (Foyer RCO) Sekce posterů (s autory ve 13:30)	
Konference histologických laborantů Předsednictvo: D. Kvapilová (Olomouc), J. Vaculová (Ostrava)		
13.45–14.00	K. Sedláčková, V. Bartoňková, T. Tichý (Olomouc) Imunofluorescence ledvin	Regionální centrum sál Perseus / česky
14.00–14.20	M. Janíková, J. Škarda (Olomouc) Dvojitá imunofluorescence na parafinových řezech	Regionální centrum sál Perseus / česky
14.20–14.40	V. Kůta (Brno) Produkty NEBNext pro přípravu knihoven pro next-gen sekvenování	Regionální centrum sál Perseus / česky
14.40–15.00	V. Žižková, M. Levková (Olomouc) Hodnocení kvality izolace nukleových kyselin z FFPE versus zmrazené tkáně	Regionální centrum sál Perseus / česky
15.00–15.20	J. Knillová, T. Jamaspishvili, M. Král, J. Bouchal (Olomouc) Využití reverzní transkripce a kvantitativní PCR v neinvazivní diagnostice karcinomu prostaty	Regionální centrum sál Perseus / česky
15.20–15.40	G. Čechová (Praha) Produkty Merck pro histologii a cytologii	Regionální centrum sál Perseus / česky
15.40–16.00	J. Vaculová (Ostrava) Informace z ČSHL a ČAZL	Regionální centrum sál Perseus / česky
16.00–16.15	Diskuze	Regionální centrum sál Perseus / česky

SPOLEČENSKÝ PROGRAM

18.00	Odjezd od RCO (odvoz autobusy zajištěn)
18.30–19.00	Zahájení a přípitek, restaurace Archa na Sv. Kopečku
19.00–20.00	Koncert F. Procházky (Jazz revival L. Armstronga)
20.00–24.00	Společenský večer v restauraci Archa na Sv. Kopečku (odvoz autobusy zajištěn)

Workshop molekulární patologie

Life Technologies: „Nová generace sekvenování a jeho využití v diagnostice“

SOBOTA, 27. DUBNA 2013

Předsednictvo: O. Holeňa (Praha), J. Steigerová (Olomouc)

Genetická analýza v digitální éře

9.00–9.30	O. Holeňa (Praha) Ion Torrent technologie–next-gen sekvenování na polovodičových čipech	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
9.30–10.00	A. Merta (Praha) QuantStudio™ a ViiA7™ – od real-time PCR analýzy k digitální PCR a OpenArray® technologii od Life Technologies/Applied Biosystems	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
10.00–10.30	J. Polínek (Praha) VectorNTI–program pro in silico-klonování a zpracování dat genetické analýzy	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
10.30–11.00	Přestávka	

Molekulární biologie „na zakázku“ aneb jak si můžete zjednodušit své experimenty

11.00–11.30	J. Kopecká (Praha) GeneArt–Technologie syntézy DNA de novo-syntéza genů na zakázku	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
11.30–12.00	A. Merta (Praha) Technologie TaqMan® – od analýzy jednotlivých genů po multigenové studie pomocí TaqMan® Array a OpenArray® karet: analýza genové exprese a microRNA, genotypizace SNP, analýza somatických mutací (metoda castPCR), analýza počtu kopií genů (CNV)	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
12.00–12.30	O. Holeňa (Praha) AmpliSeq™ – next-gen sekvenování genů podle Vašeho výběru	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky
12.30–13.00	Diskuze	Teoretické ústavy (2. patro, místnost 2.517) LF UP / česky



Ing. Milena Španělová - SpinChem
Těšínská 6, 31200 Plzeň
tel., fax: +420 377 265 214
info@spinchem.cz, www.spinchem.cz

Zajistíme pro Vás

produkty pro široké spektrum použití.
Zastupujeme řadu zahraničních firem a nabízíme sortiment
pro výzkumné i praktické využití v medicíně a různých přírodních vědách.

Adipogen AG, Switzerland	http://www.adipogen.com
Biomol GmbH (Německo)	http://www.biomol.de
Covance Research Products Inc. USA	http://www.crpinc.com
Exalpha Biologicals, Inc. MA, USA	http://www.exalpha.com
Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. PA, USA (UK)	http://www.jacksonimmuno.com
ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Israel	http://www.prospecbio.com
Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA	http://www.scbt.com
Spectrum Laboratories, Inc. USA (NL)	http://eu.spectrumlabs.com

Nabízíme služby při dovozu produktů i od jiných firem podle vašich potřeb

Honorary guests

Jaroslav Mokrý, Professor, M.D., Ph.D.

Jaroslav Mokrý currently holds the position of Head of the Department of Histology and Embryology at Charles University Medical Faculty in Hradec Kralove. He has been working in the Department of Histology and Embryology at Charles University Medical Faculty in Hradec Kralove since 1985. He completed his M.D. degree in general medicine from Charles University in Prague in 1990. In 1993–1994 he was on his research stay in the Department of Human Anatomy, Oxford University, UK, where he was engaged in cultivation of fetal dopaminergic neurons. He defended his Ph.D. thesis in 1995 and was appointed Professor of Histology and Embryology in 2006. He was awarded Charles University Rector's Prizes in 1987 and 1990 and Young Histochemist Award from International Federation of Societies of Histochemistry and Cytochemistry in Kyoto, Japan, in 1996. He is president of Czech Society for Histo- and Cytochemistry and vice-president of Czech Anatomical Society. He published 130 research articles and presented over 300 lectures or posters. Main focus of his scientific activity covers the areas of stem cell biology, regenerative medicine, cell cultivation, cell transplantation, cell therapy, cell differentiation, angiogenesis, detection of molecules in situ and histology.

CURRICULUM VITAE



Invited guests

Giorgio Stanta, Professor, M.D., Ph.D.

Giorgio Stanta is Professor of Pathology at the Medicine, Surgery and Health Department at the University of Trieste. His main interest is molecular medicine and particular translational and diagnostic molecular pathology, mainly oncology. He is the head of the Molecular Histopathology Laboratory in the Cattinara Hospital in Trieste. He participates, as an expert, in the Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI). He is the coordinator of the European Group for molecular analysis in archive tissues of the European Society of Pathology and he is a member of the Management Board of "Molecular Pathology Study Group" of "European Society of Pathology" and a member of the executive committee of the Italian Reference Centre for BBMRI (European Infrastructure for Biobanking) as an expert in molecular analysis in human tissues and tissue biobanks. Giorgio Stanta is the coordinator of the European group IMPACTS "Archive tissues: improving molecular medicine research and clinical practice", involving around twenty major university hospitals in 11 countries, with over 100 researchers (www.impactsnetwork.eu) and the coordinator of the biobanking network of pathological tissues at the Italian national level (NIPAB – Network of Italian Pathology Archives Biobank) and he is also the coordinator of the European biobanking network "Pan-European Archive Tissue Biobanking Network", involving European pathologists in collaboration with the European Society of Pathology (ESP) and with the European Infrastructure for biobanks (BBMRI). He is the editor of the "Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues", those tissues which are fixed and paraffin embedded (paraffin is the only clinical material used in hospital for any kind of diagnostics). This book will be soon published by Springer Verlag. Giorgio Stanta was appointed as an expert by the European Commission for FP7.

CURRICULUM VITAE



Tissue micro-environment in molecular pathology

Giorgio Stanta

Department of Medical, Surgical and Health Sciences, University of Trieste, Italy

Research and diagnostics on clinical material is always performed on fixed and paraffin embedded tissues. This aspect makes it necessary to develop molecular techniques in this type of tissues, also called archive tissues. The disadvantage of this analysis is the poor quality of nucleic acid preservation and the advantage is the huge number of samples available in many pathology departments with the possibility to collect any kind of even rare lesion.

Availability of a large number of clinical samples makes it easier to analyze tissue heterogeneity in malignant tumours. We have experimental evidence that they are composed by genetically and epigenetically different clones, that can interact functionally.

Recent experimental evidence has also shown that there is a phenotypic plasticity at the mRNA and protein level that is often stochastic. This makes it very complex to analyze tumour tissues

and gives us account of the extreme variability that we can find when clinical tissues are analyzed. Part of this complexity is also related to the stromal micro-environment that can heavily affect the functional level and phenotypic plasticity. This makes any standardization at the diagnostic level very complex.

Jiří Bártek, Professor, M.D., Ph.D.

Jiří Bártek obtained his M.D. degree from the Palacký University in Olomouc, and Ph.D. at the Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Prague in 1983. Jiří Bártek then worked at the Oncology Institute in Brno, the Imperial Cancer Research Fund Laboratories in London, the German Cancer Research Center in Heidelberg, and as a Head of Department at the Institute of Hematology in Prague. In 1992, he was appointed a senior scientist at the Danish Cancer Society in Copenhagen, Denmark, where he is (since 1997) the Head of the Department of Cell Cycle and Cancer, and since 2005 also the Deputy Director, Centre for Genotoxic Stress Research. Jiří Bártek is a member of EMBO and other scientific organizations, he published over 300 articles in international scientific journals, and he is the most frequently cited Czech scientist globally. His major achievements include insights into the roles of p53 and pRB tumor suppressors, discoveries of several checkpoint pathways, and identification of the DNA damage response machinery as anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. His current interests focus on mechanisms of cell cycle control, genome integrity, involvement of these pathways in tumor development, and translational research into personalized treatment of cancer.

CURRICULUM VITAE

Interplay of tissue microenvironment and cellular DNA damage response machinery in genome (in)stability and senescence in inflammation and cancer

Bártek Jiří

Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark

Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University, Olomouc

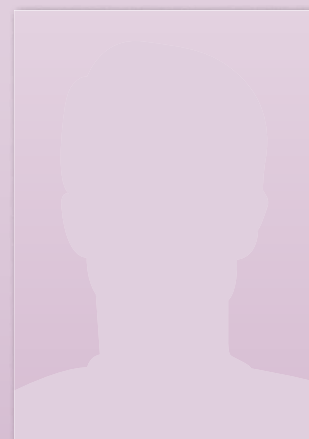
Recent advances in research on molecular mechanisms underlying major human pathologies such as chronic inflammation and cancer point to an intimate interplay between factors in tissue microenvironment and intracellular pathways including the genome maintenance machinery, often referred to as the DNA damage response (DDR). This lecture will summarize our most recently published and unpublished results that provide novel tools to assess the tissue pathology processes and the status of cellular senescence and DNA damage signaling, as well as unexpected mechanistic insights into the pathways and genes that are critical for suppression of chromosomal instability and cancer. Emphasis will be

on the interplay of cytokine signaling, oxidative stress caused by reactive oxygen species and nitric oxide as factors important in inflammatory pathologies and senescence, in the interplay with cellular DNA damage response network governed by the ATM/ATR kinases and their many targets. In terms of disease focus, inflammatory bowel disease and colorectal cancer will be used as examples of human pathologies in which cytokine signaling, cellular senescence and genome/chromosome instability play key roles. Furthermore, given the focus of the conference, we will discuss our efforts to introduce and validate various markers of cellular senescence, with particular emphasis on attempts to optimize detection

in routine formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. A new marker shared by cells undergoing all forms of senescence (replicative, oncogene-induced and drug-induced senescence) that we believe to be superior to the classical beta-galactosidase marker and also suitable for detecting senescent cells in routinely processed, paraffin tissues. Cellular defences against oxidative DNA damage will also be discussed, with focus on differences between cancer stem cells and the bulk of tumour cells (here using human glioblastoma as an example), revealing stem cell vulnerability that could be exploited in targeted therapy.

Olivier Cuvillier, MSc., Ph.D.

Olivier Cuvillier gained the M.Sc. degree in Biochemistry in 1990 and the Ph.D. degree in Ph.D in Biochemistry in 1994, both at the University of Sciences and Technologies of Lille, France. He is currently the head at the Sphingolipids & Cancer Research Laboratory, Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse. He is interested in sphingolipid metabolism, signal transduction, angiogenesis, hypoxia, prostate cancer, kidney cancer, bone metastasis and chemoprevention. He is an author of more than 42 original papers and more than 30 reviews and book chapters. Dr. Cuvillier is a reviewer and expert for 55 peer-reviewed journals (Nat Reviews Cancer, Blood, Cancer Res, Faseb J, Leukemia, Oncogene, PloS One, Mol Cancer Ther, Cancer Prev Res, Int J Cancer, etc.) and 19 research agencies and charities from 11 different countries (France, UK, Belgium, Italy, Switzerland, Cyprus, Austria, Czech Republic, Russia, Singapore, Hong Kong). He is a member of New York Academy of Sciences, French Society of Angiogenesis, European Association for Cancer Research, French Cancer Society, American Association for Cancer Research and French Society for Biochemistry and Molecular Biology.

CURRICULUM VITAE**Hypoxia in prostate cancer****Cuvillier Olivier***Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse Cedex, France*

Hypoxia or low-oxygen conditions is a characteristic of a wide array of solid tumors, associated with tumor progression, neoangiogenesis and resistance to therapeutics. Unlike in vitro

and animal studies, inconsistencies and unanswered questions exist regarding the role of hypoxia and angiogenesis in prostate cancer at the clinical level. Our talk will outline the role of hypoxia

in prostate cancer, the domains where additional studies would be required and the therapeutic potential of targeting strategies.

Karel Smetana, Professor, M.D., Ph.D.

Karel Smetana is Professor of Anatomy at the Institute of Anatomy, 1st Faculty of Medicine, Charles University, from where he graduated in 1983. Dr. Smetana is a member of many professional commissions and scientific societies, including the Grant Agency of the Czech Republic. His work is focussed on cell and developmental biology, especially on squamous epithelia in physiological and pathological condition. He is an author of more than 170 papers, patents and textbook chapters, with articles cited more than 750 times and an H-index of 19. His work has been recognized by the National Scientific Award of the Czech Republic (2002), by award of Int. J. Oncol. (2005) and by the Annual Award of Minister of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (2010).

CURRICULUM VITAE**Cancer stromal fibroblasts: biology and possibilities of therapeutic manipulation**

Dvořánková Barbora¹, Szabo Pavol¹, Kodet Ondřej^{1,2}, Gabius Hans-Joachim³, Strnad Hynek⁵, Kolář Michal⁴, Smetana Karel Jr.¹

¹Charles University, 1st Faculty of Medicine, Institute of Anatomy, Prague, Czech Republic

²Charles University, 1st Faculty of Medicine, Department of Dermatovenereology, Prague, Czech Republic

³Ludwig-Maximilians University, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Physiological Chemistry, Munich, Germany

⁴Institute of Molecular Genetics, Academy of Science of the Czech Republic vvi, Prague, Czech Republic

Similarly to normal organs and tissues, malignant tumor represents a complex tissue which needs many supporting structures including fibroblasts, so called cancer-associated fibroblasts (CAF). They frequently express smooth muscle actin and produce extracellular matrix and numerous bioactive cytokines. CAF participate in the formation of permissive microenvironment that is important for tumor cells survival and expansion including metastasation (in collaboration

with leukocytes). Some data indicate that this microenvironment is essential for function of cancer stem cells. The mutual crosstalk between cancer cells and CAF is similar to epithelial-mesenchymal interaction observed in the healing wounds as was described almost 30 years ago. The cancer microenvironment including CAF seems to represent a potential target of anticancer therapy. The therapeutic manipulation of this microenvironment needs further

extensive research and answering the questions about the origin of CAF, the molecular mechanism of cancer cell-CAF interaction and possibility of control of CAF activity.

References

1. Dvořánková, et al.: Cells Tissues Organs 194: 469–480 (2011)
2. Kolář, et al.: Biol. Cell 104: 738–751 (2012)
3. Plzák, et al.: Anticancer Res. 30: 455–462 (2010)
4. Szabo, et al.: Biol. Cell 103: 233–248 (2011)
5. Valach, et al.: Int. J. Cancer 131: 2499–2508 (2012)

Holger Erb, MSc.

Holger Erb studied biology in Ulm and graduated 2009. At the moment he is a PhD student in the group of Prof. Zoran Culig at the Department of Urology, Innsbruck Medical University. His major research interest is on the influence of cytokines on prostate cancer stem cells.

CURRICULUM VITAE**Interleukins 4 and 6 in Prostate Cancer progression**

Holger Erb, Frédéric R. Santer, Zoran Culig

Experimental Urology, Department of Urology, Innsbruck Medical University, 6020, Austria

Prostate cancer (PCa) is one of the most common male cancers. Androgen deprivation is still a key therapeutic strategy in PCa. However, a small number of prostate cancer cells manage to survive anti-androgen therapies and is on the basis of relapses to a castration resistance PCa (CRPCa) state within one to two years. Several groups have been suggested that current therapies kill proliferating differentiated cells, but undifferentiated quiescent cancer stem cells (CSCs) survive and are responsible for relapse. Beside the development of CRPC it has shown that androgen ablation induces T cell infiltration of the prostate gland, leading to T cell-mediated inflammation. Inflammation processes are regulated by cytokines which play an important role in the crosstalk between cancer cells and the

microenvironment. Several cytokines e.g. interleukin (IL)-6 and IL-4 have been identified as an important factor in PCa progression.

High IL-6 protein levels correlate with advanced stages and poor prognosis of PCa. *In vitro* studies demonstrated that IL-6 treatment increase androgen receptor activity what lead to an increased tumor cell proliferation or differentiation. Also it has been shown that IL-6 increases PCa cells resistance to the anti-androgen bicalutamide. Furthermore, data from a phase I study of an anti-interleukin-6 therapy showed a downregulation of genes implicated in tumorigenesis.

Although the role of IL4 has been less investigated in PCa, it is known to be elevated in tissue of PCa. Recently, it has been reported that IL-4 activates the androgen receptor in a ligand-

independent manner by increasing the expression of co-activators CBP/p300. Interestingly, a morphologic change of the PC3 cell line to a more dedifferentiated phenotype was observable after long-term IL-4 treatment. Although changes in proliferation after treatment with IL-4 were not observed, clonogenic assays with primary PCa cells revealed that IL-4 increases the number of colonies. Furthermore, it has been shown that CSCs have an increased level of IL-4 receptor mRNA compared with the more differentiated cells.

Concluded, it has been shown that cytokines play an important role in Prostate Cancer tumor initiation, progression and the development of therapy resistance. Because of this they are an ideal target for the development of new therapy strategies.

Amniotic fluid stem cells and their clinical implication

Kapil Dev, Mokřý Jaroslav, Diaz Daniel, Rishikysh V. Pisal

Department of Histology and Embryology, Charles University in Prague, Medical Faculty in Hradec Kralove, Czech Republic

Human amniotic fluid has been used in prenatal diagnosis for more than 70 years and existence of stem cells in amniotic fluid was reported for the first time almost eight years ago. It has proven to be a safe, reliable and simple screening tool for a wide variety of developmental and genetic diseases. Today, amniotic fluid stem (AFS) cells are widely accepted as a new powerful tool for basic research as well as for the establishment of new stem cell based therapy concepts. Human AFS cells have become an attractive stem cell source for medical therapy due to both their ability to propagate as stem cells and the lack of ethical debate that comes with the use of embryonic stem cells. AFS cells are known to yield a number of cell types which are multipotent, ethically derived, genetically stable, easily

grown, expanded and possess favorable immunogenicity, which has resulted in an increasing interest for use in various diseases. Different forty six samples of AFS cells were carried away for culturing and characterization purposes with RT-PCR, immunocytochemistry and staining methods. Ten samples were used for chemical induced guided differentiation of amniotic fluid derived cells into neurogenic, adipogenic and osteogenic cells followed by particular staining i.e. oil-red-O and von Kossa for morphological bases and RT-PCR confirmation with nestin, fatty acid binding protein (FABP)-4 and osteocalcin, respectively. These cells are characterized by the expression of mesenchymal as well as pluripotency markers (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD133, Oct-4 and SSEA-4) and neural

(nestin, β III-tubulin, NEFH) markers. They are capable of differentiating into diverse derivatives in vitro. Clonal human lines verified by retroviral marking were induced to differentiate into various cell lineages, including hematopoietic, adipogenic, osteogenic, myogenic, endothelial, hepatogenic, chondrocytic, pulmonary, cardiac and neurogenic. These undifferentiated cells proliferated without feeders layer and conserve a normal karyotype with long telomeres over long culture periods. Most important their own advantageous properties, amniotic fluid stem cells are emerging as a novel source in anticancer and antitumor therapy.

This work was supported by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic, project no. CZ.1.07/2.3.00/30.0022.

Jiří Hejnar, DrSc., Ph.D.

Jiří Hejnar obtained his master degree from J.E. Purkyne University Brno (today Masaryk University) in 1985. After completing his doctoral training at the Institute of Molecular Genetics, Prague, in the laboratory of Jan Svoboda, he received his PhD at the Czechoslovak Academy of Sciences in 1996 in the field of retroviruses and oncogenes. Jiri Hejnar worked in John Wyke's lab at the Beatson Institute of Cancer Research in Glasgow in 1993 and 1996 as a fellow of NATO pre- and postdoctoral awards. Since 1997, Jiri Hejnar is a head of Viral and Cellular Genetics Department at the Institute of Molecular Genetics, Prague, which focuses on transcription regulation of integrated retroviruses, fusogenic endogenous retroviruses, receptors for retroviruses and mobile elements in the mammalian genome. Hejnar's lab is interested also in epigenetics – how chromatin structure and DNA methylation/demethylation are utilized in silencing/expression of retroviruses and establishing the latency of HIV-1.

CURRICULUM VITAE

Increased expression of Tet-1 associated with 5-methylcytosine hydroxylation in seminoma

Trejbalová Kateřina¹, Dobšová Martina¹, Matoušková Magda¹, Vernerová Zdena², Hejnar Jiří¹

¹Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, Prague, Czech Republic

²Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruska 87, Prague, Czech Republic

DNA methylation at the 5 position of cytosine (5-mC) followed by guanine is a key epigenetic mark that is often aberrantly increased or decreased in cancer and other pathological processes. 5-mC can be converted to 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) by the activity of ten-eleven translocation (TET) family of DNA hydroxylases and further demethylated by various cellular processes. Although this active demethylation of DNA normally occurs

in early mammalian development, several recent reports describe the loss of TET expression and 5-hmC in glioblastoma, melanoma, and colon carcinoma. These changes might be a part of so called methylator phenotypes and can be of diagnostic and prognostic importance. Here we show an unusual TET-1 overexpression in seminomas and mixed germinal tumors with seminoma components. The increased proportion of 5-hmC at the expense of 5-mC

will be demonstrated at the whole-genome level as well as at particular gene promoters. We show that isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) gene is not inactivated by mutations and produces normal levels of alpha-ketoglutarate necessary for the TET family enzymes. Thus, our study reveals an interesting epigenetic and epigenomic phenotype in seminoma.

Marie Jirkovská, Associate Professor, M.D., Ph.D.

Marie Jirkovská graduated in general medicine in 1980 from the Faculty of General Medicine Charles University in Prague, defended her Ph.D. thesis „The structural heterogeneity of placental barrier“ in 1993, and received an Associate Professorship in histology and embryology in 2010. From 1987 to 1990 she studied a postgraduate course „Basic mathematical methods of the data processing“. Since 1980 she works as a teacher of histology for medical students and histological techniques for specialists in medical instrumentation. Her recent research activities are focused above all on the impact of maternal diabetes mellitus on the structural features of placenta (e.g. spatial arrangement and branching pattern of villous capillaries, structure of villous stroma). Her bibliography includes over 40 original papers. She is a member of several Czech and international scientific societies.

CURRICULUM VITAE

Maternal diabetes influences proliferative potential and cell differentiation in fetoplacental capillaries

Jirkovská Marie¹, Jadrníček Martin¹, Nedobová Veronika¹, Moravcová Milena², Krejčí Vratislav², Žižka Zdeněk²

¹*Institute of Histology and Embryology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic*

²*Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic*

Structural changes of placenta caused by maternal diabetes mellitus are characterized as delayed villous maturation. It includes among other great variability of vascularity in terminal villi manifested by focal occurrence of either large and strikingly hypovascular villi or large hypervascular villi. Our previous work has shown that in branched terminal villous capillary bed of term placenta, the signs of both the longitudinal and sprouting capillary growth occur till the end of pregnancy, and that the villous capillary bed is more complicated due to enhanced capillary branching in placentas from pregnancies complicated by gestational as well as maternal diabetes type 1. Also the stromal architecture of pathological placental terminal villi shows changed configuration which is favourable for development of altered capillary arrangement, i.e. enhanced capillary branching, more waved capillary course and enlarged capillary diameter. All those morphological changes contribute to the enlargement of the total area of placental capillary wall in order to achieve better oxygen supply.

The rapid development of terminal placental villi and placental capillary bed

inside them starts about at 25th week and continues up to the end of gestation. There is no doubt that it is carried out by three well-balanced processes, i.e. cell proliferation, differentiation and apoptosis. Here we tested the hypothesis that the increased angiogenesis in diabetic placenta is connected with greater proliferative potential of cells constituting capillary wall and with greater proportion of differentiating cells in villous capillaries. The Ki-67 antigen as a marker of active phases of cell cycle and nestin as a marker of postmitotic endothelial cells and pericytes were used for the quantitative morphological study of carried on 8 normal and 18 diabetic (DM I) term placentas.

In both examined groups, the Ki-67 positive nuclei occurred in villous cytotrophoblast and cells of capillary wall. In DM I placentas, we observed conspicuously lower frequency of those nuclei in both pathological forms of villi. The mean number of labeled nuclei of cytotrophoblast as well as the mean number of labeled nuclei in the capillary wall per square millimeter of section were significantly lower in DM I group (32.2 ± 14.7 vs. 19.9 ± 12.2 for cytotrophoblast and 10.1 ± 4.6 vs. $5.2 \pm$

4.5 for cells of capillary wall respectively). The detection of nestin has shown that postmitotic cells are arranged in a patchy manner in the capillary wall. Nestin-positive proportions of the capillary circumference were found also significantly different (0.20 ± 0.05 in control vs. 0.32 ± 0.09 in diabetic placentas).

Our findings suggest that maternal diabetes mellitus influences placental capillary bed in a complex manner. The decreased proliferative potential of cytotrophoblast and cells of capillary wall may cause lower ability of placenta to enlarge the area of syncytiotrophoblast and capillary wall in terminal phase of pregnancy. Moreover, higher proportion of differentiating cells in the capillary wall may be associated with less effective capillary function. These changed qualities of fetoplacental capillary wall attributable to maternal diabetes can adversely influence fetal well-being at the end of pregnancy.

This work was supported by the PRVOUK P25/LF1/2.

References

1. Jirkovská M. et al.: J Vasc Res 2002; 39: 268–278.
2. Jirkovská M. et al.: Placenta 2012; 33: 343–351.

Ondřej Slabý, Associate Professor, Ph.D.

Ondřej Slabý obtained his PhD degree in Oncology at Masaryk University in Brno in 2008. He is currently working as scientific secretary at the Masaryk Memorial Cancer Institute in Brno and research group leader (Molecular Oncology II) at the Central European Institute of Technology at Masaryk University. Dr. Slabý has published extensively in the area of non-coding RNAs. He published more than thirty impacted papers and three scientific monographs. His main research interests are in the microRNAs significance in solid cancer and their translational potential in diagnostics and as the therapeutic targets. Dr. Slabý is a member of American Association of Cancer Research, European Association for Cancer Research, Czech Society of Oncology, Czech Society for Biochemistry and Molecular Biology (member of FEBS), and others. In 2009, dr. Slabý founded Cancer Biology Section of Czechoslovak Biological Society and in 2012 co-founded Neurooncological Section of Czech Oncological Society. In 2010 and 2012 received award of Czech Oncological Society. He is a member of the editorial board of the World Journal of Gastroenterology, World journal of Gastrointestinal Oncology, Biomarker Research and Clinical Oncology. As a peer-reviewer collaborates with a number of respected scientific journals from the field, for instance British Journal of Cancer, European Journal of Cancer, PLoS ONE, Cancer Letters, Oncology, Human Pathology, etc.

CURRICULUM VITAE**MicroRNAs in solid cancer: from biomarkers to therapeutic targets****Slabý Ondřej**

Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno
CEITEC, Masaryk University, Brno

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs 18–25 nucleotides in length that downregulate gene expression during various crucial cell processes such as apoptosis, differentiation and development. Changes in the expression profiles of miRNAs have been observed in a variety of human solid tumors. Functional studies indicate that miRNAs act as tumor suppressors and oncogenes. These findings significantly extend concept of molecular pathogenesis of cancer and have shown great potential

for miRNA as a novel class of therapeutic targets. Several investigations have also described the ability of miRNA expression profiles to predict prognosis and response to selected treatments in cancer patients, and support diagnosis of origin among cancer of unknown primary site. miRNAs' occurrence has been repeatedly observed also in blood serum and plasma, and miRNAs as novel minimally invasive biomarkers have indicated reasonable sensitivity for cancer detection. This lecture covers

introduction to miRNA biology, miRNA involvement in the hallmarks of cancer, the knowledge regarding miRNAs functioning in pathogenetic signaling pathways and their potential to serve as disease biomarkers and novel therapeutic targets in the colorectal cancer, renal cell carcinoma and glioblastoma in order to our recent observations. Supported by Internal Grant Agency of Czech Ministry of Health: NT13549-4/2012, NT13860 4/2012, NT11214-4/2010 and NT13514-4/2012.

Martin Petřek, Professor, M.D., Ph.D.

Academic Affiliation: Professor of Immunology, Principal Investigator at Laboratory of Immunogenomics and Immunoproteomics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc. Director, Tissue Typing (HLA) Laboratory (EFI accredited).

Hospital affiliation: Department of Clinical and Molecular Pathology, Laboratory of Cardiogenomics, University Hospital Olomouc

Research Interests:

Genetics of immune-mediated disease of respiratory and cardiovascular system.

Immunogenetics of organ and hematopoietic transplantation.

Author of approx. 75 papers in impacted journals (American Journal of Respiratory and Critical Medicine, European Respiratory Journal, BMC Medical Genetics, Cytokine, Bone Marrow Transplantation etc.). Journal/Funding bodies reviewer. H-index: 18.

Societies: European Federation of Immunogenetics (EFI) - member of the Executive Committee

CURRICULUM VITAE

Expression of eight candidate miRNAs in aortic valves from patients with aortic stenosis

Petrkova J.^{1,2}, Borucka J.², Michalek J.³, Lonsky V.⁴, Navratilova Z.², Kolar Z.³, Taborsky M.¹, Petrek M.^{2,3}

¹Palacky University, Faculty of Medicine and Dentistry, 1st Dept of Internal Medicine-Cardiology, Olomouc, Czech Republic

²Lab. of Immunogenomics, Inst. Molecular & Translational Medicine, Fac. of Medicine, Palacky Univ., Olomouc, Czech Republic

³Institute of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

⁴Palacky University, Faculty of Medicine and Dentistry, Department of Cardiosurgery, Olomouc, Czech Republic

Background and aim: MicroRNAs (miRNAs) have been recently implicated in atherosclerosis. Underlying cause of aortic stenosis, calcific aortic valve disease (CAVD) is a process similar to atherosclerosis. We, therefore, investigated a role of 8 candidate miRNAs in patients with aortic stenosis.

Patients and methods: miR-21, -29b, -133b, -146a, -150, -155, -181b & let-7a expression in valvular tissue from 58 aortic stenosis patients, who underwent aortic valve replacement with consent for the study, was analyzed by qRT-PCR with RNU6B as reference gene. miRNA expression was compared between 2 patient subgroups: those

with (n=26, A) and without (n=32, NA) coronary atherosclerosis, defined by >30% limitation of perfusion at pre-operative angiography. Valve tissues were evaluated by histopathologists to grade chronic inflammation and fibrosis extent.

Results: All investigated miRNAs were detected in all study samples. Analysis reflecting division of the study subjects into A / NA subsets showed that all studied miRNAs are upregulated in atherosclerosis, with p values ranging from 0.001 for miR-133b, to 0.01 for miR-146a, miR-181b & let-7a, to 0.02 for miR-21, miR-29b & miR-150, up to 0.03 for miR-155. Further, elevation of three miRNAs (miR-29b [p=0.04], miR-150 [0.03]

and miR-181b [0.02]) was observed in patients with inflammatory infiltration of valves (n=13) compared to those without inflammation (n=24).

Conclusions: Our data support involvement of the investigated miRNAs in this valve pathology and suggest relationship of miR29b, 150 & 181b with valve inflammation. Observed upregulation of candidate miRNAs in aortic stenosis deserves further study including detailed clinical subphenotyping and characterisation of miRNA targets.

Grant support: IGAPULF2013_009, CZ.1.05/2.1.00/01.0030

Jana Nekvindová, DrSc., Ph.D.

Jana Nekvindová, DrSc., Ph.D. (*1980) is a young researcher working at University hospital Hradec Králové and at the Institute for molecular and translational medicine, Palacky University, Olomouc. She graduated in medical bioanalytics at Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in 2004. During her PhD studies at the Faculty of Medicine, Palacky University in Olomouc and partially at the Center for functional genomics and bio-chips, University of Ljubljana, Slovenia, she started to study drug metabolism and gene expression of cytochromes P450 (CYPs). In 2007–2009 she joined as a post-doc the pharmacogenetics group at Karolinska Institute in Stockholm, Sweden. She contributed to the knowledge about CYPs gene expression regulation and posttranslational modifications. Feeling the need to make research in biomedicine closer to clinical care, she moved to a hospital (specialization in clinical genetics 2011). Her research is still mainly focused on pharmacogenetics, oncogenetics and epigenetics and her work has been appreciated by several awards including the Czech Society for Clinical and Experimental Pharmacology best publication in the young researchers' category in 2010.

CURRICULUM VITAE**CYP2W1 in colorectal cancer**

Nekvindová J.^{1,2}, Gomez A.², Karlgren M.², Anzenbacher P.¹, Ingelman-Sundberg M.²

¹*Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine, Palacký University in Olomouc, Czech Republic*

²*Institute of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden*

Enzymes of the large and diverse cytochrome P450 (CYP) family are involved in various cellular processes in human. Besides their most discussed role in metabolism of drugs and other xenobiotics, CYPs play an important role in endogenous metabolic pathways including metabolism and/or biosynthesis of cholesterol and of bile acids, steroids, retinoic acid, vitamin D₃, arachidonic acid and its eicosanoid derivatives (e.g. prostaglandins). Mutations or genetic variation of the CYP genes leading to defect of the particular enzymatic activity can result in severe inborn metabolic disorders or significantly altered drug metabolism. Metabolites produced by CYP enzymes can participate on carcinogenesis. An unintended „activation“ of procarcinogens as well as production of reactive intermediates increases genotoxic stress of the cells and may cause tumour initiation. CYP activity also affects inflammatory processes and signalling pathways that control cell cycle and apoptosis, both with implications for tumour promotion and progression. It is obvious that the mechanisms are very complex. Furthermore, even in human there are still quite many

orphan CYPs with yet unknown function. Interspecies comparison of CYP genes – proteins – and respective metabolic activities is difficult and the fact that there are thousands of CYPs throughout all kingdoms of life does not make things much easier. However, CYP deorphanization may be a really exciting process.

CYP2W1, a novel human cytochrome P450 form, was first cloned only a few years ago (Karlgrén et al., 2006). This interesting CYP was found to be expressed mainly in fetal or neoplastic tissues (especially in colorectal cancer), whereas its expression in healthy adult tissues is rather low. Such an expression pattern makes CYP2W1 a possible therapeutic target. The CYP2W1 gene expression is epigenetically regulated as demonstrated in vitro as well as in colon cancer samples. The expression of CYP2W1 during fetal period also suggests that it could be involved in cell growth or differentiation processes and such a function may be reiterated later in carcinogenesis. Recent studies also evaluate the prognostic value of CYP2W1 expression in colon cancer (higher expression is associated with worse clinical outcome). Only a little

information is available on the CYP2W1 active site topology and the substrate binding although a few models were already published. Concerning the metabolic activity, it is reported that CYP2W1 metabolizes benzphetamine and arachidonic acid and activates several procarcinogens, particularly polycyclic aromatic hydrocarbons, which may be of significance in carcinogenic processes. CYP2W1 has been also shown to catalytically activate certain compounds to cytotoxic (antitumour) products so the enzyme could serve as a novel drug target for the treatment of colon cancer.

While there is still a lot of work needed to be done before a successful prodrug can be designed and tested in cancer treatment, there has been done a major progress in terms of CYP2W1 gene and protein characterization. The CYP2W1 gene is polymorphic with several splice variants. There are also several non-synonymous SNPs in the gene that may alter the enzyme function. Interestingly, some of the variant alleles have been shown to be associated with the colorectal cancer risk. The CYP2W1 protein has also several interesting features. Unlike other CYPs,

it is oriented towards the lumen of the endoplasmic reticulum where it is available to the glycosylation machinery and it really is glycosylated at position Asn177. The glycosylation may facilitate processing and cell surface expression of the protein and indeed, CYP2W1 (both the glycosylated and non-glycosylated form) was detected on the cell surface. Such an alternative localization can be targeted but it is also an important factor during drug discovery and development.

To conclude, CYP2W1 is a promising object for further research. It has a

potential to be both prognostic marker and a therapeutic target for a cytostatic prodrug or maybe a specific antibody in the treatment of colon cancer.

Acknowledgement: The work was supported by the OPVK project CZ.1.07/2.3.00/20.0019, the Swedish Cancer Foundation and the Swedish Research Council.

Literature

1. Stenstedt K, Hallstrom M, et al. *Anticancer Res.* 2012 Sep; 32(9): 3869–3874.
2. Wang K, Guengerich FP. *Chem Res Toxicol.* 2012 Aug 20; 25(8): 1740–1751.
3. Gomez A, Nekvindova J, et al. *Mol Pharmacol.* 2010 Dec; 78(6): 1004–1011.
4. Gervasini G, de Murillo SG, et al. *Pharmacogenomics.* 2010; 11(7): 919–925.
5. Gomez A, Karlgren M et al. *Pharmacogenomics.* 2007 Oct; 8(10): 1315–1325.
6. Li W, Tang Y, et al., *J Mol Graph Model.* 2009; 28(2): 170–176.
7. Edler D, Stenstedt K, et al., *Eur J Cancer.* 2009; 45(4): 705–712.
7. Karlgren M, Ingelman-Sundberg M. *Expert Opin Ther Targets.* 2007; 11(1): 61–67.
8. Wu ZL, Sohl CD, et al. *Mol Pharmacol.* 2006; 69(6): 2007–2014.
9. Karlgren M, Gomez A, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 341(2): 451–458.

Collection, transfer and storage of biospecimens: innovative solutions

Locatelli Paolo

Milestone srl (bamed s.r.o.), Bergamo – Sorisole - Italy

The pre-analytical step is very important in any scientific inquiry and also in molecular pathology it should not be overlooked.

In fact, tissues to be analyzed are not sampled directly by the operator conducting the investigation and this is a critical aspect of this phase.

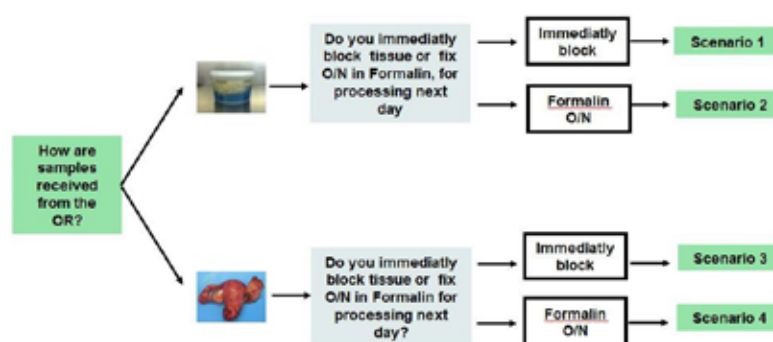
Sample is removed by surgeon/nurse and then sampled by pathologist/technician for the histological procedure.

Examining the situation to find a proper solution, we have found that grossing procedures can be gathered in four main groups, according to:

- How samples are received: fresh or already fixed tissues
- Grossing Mode: immediate sampling or blocking after O/N fixation

We have noticed that the use of dedicated technologies in the pre-analytical phase of the chain leads to many benefits, in terms of costs, safety, quality of the results in all the above listed scenarios.

In particular, our research has demonstrated that the routine transportation of under-vacuum sealed samples allows to get optimum results in terms of both good histological quality and of quantity of material available for molecular analysis



Praktické použití cobas® PIK3CA mutačního testu

Blanárik Igor

Roche, s.r.o., Praha

V roce 2004 vědci v Johns Hopkins Kimmel Cancer Center a Howard Hughes Medical Institute našli mutace v genu PIK3CA spojené s tumorogenezí a progresí onemocnění tlustého střeva a jiných karcinomů. Je jedním z nejvíce mutovaných onkogenů uvedených v lidských nádorech. Většina hlášených mutací se vyskytuje v několika tzv. hotspotech v genu (kodony 1047 (~ 40%), 545 (~ 25%), a 542 (~ 13%). Pacienti s nádory, které obsahují PIK3CA mutace, mohou mít prospěch z léčby zaměřené na mutantní PIK3CA nebo navazující cíle v metabolické dráze. Existují tři třídy PI3Ks, třída IA PI3K je ta, která je spojována s lidským karcinomem. PIK3CA je 34 kb gen na chromozómu 3q26.3, který se skládá z 20 exonů kódujících 1068 aminokyselin tvořících protein velikosti 124 kDa. Kóduje p110α katalytickou podjednotku a je aktivován stimulací růstového faktoru prostřednictvím tyrosinkinázových receptorů (RTKs) a G-proteiny vázanými receptory. Cesta PIK3 moduluje růst, proliferaci, metabolismus, přežití a angiogenezi. Mutace může způsobit rezistenci k apoptóze, podporovat buněčnou migraci a invazi in vitro i in vivo. PI3K je v srdci signalizace receptoru růstového faktoru a kontroly buněčného cyklu a proto je slibným cílem léčby

EGFR monoklonálními protilátkami. Mutační stav PIK3CA není vzájemně exkluzivní k EGFR nebo KRAS. Bylo prokázáno, že KRAS a PIK3CA koexistují v CRC a k překonání rezistence bude potřebné cílení na obě cesty. Omezené údaje ukazují, že stav PIK3CA mutací exonu 9 v mCRC nemá vliv na účinnost cetuximabu s chemoterapií, ale mutace v exonu 20 byly spojeny s nízkou odpovědí. PIK3CA mutace se zdají být negativním prediktorem k terapii EGFR monoklonálními protilátkami.

Mutační test cobas® PIK₃CA je real-time PCR test určený výhradně pro výzkumné účely (research use only – RUO) pro kvalitativní detekci a identifikaci mutací v exonech 1,4,7,9 a 20 fosfoinositid-3-kinázy, katalytického, alfa (PIK3CA) genu v DNA derivované z formalin parafrinované (FFPET) tkáně. Vzorky jsou zpracovány pomocí soupravy cobas® DNA Sample Preparation Kit pro manuální přípravu vzorku a pomocí analyzátoru cobas® z 480 pro automatizovanou amplifikaci a detekci. Test cobas® PIK3CA Mutation Test je založen na dvou hlavních procesech: (1) manuální příprava vzorku za účelem získání genomické DNA z FFPET; (2) PCR amplifikace a detekce cílové DNA pomocí komplementárních párů primerů a oligonukleotidových sond

označených fluorescenčním barvivem. Test je určen k detekci R88Q v exonu 1, N345K v exonu 4, C420R v exonu 7, E542K, E545X (E545A, E545D8*, E545G a E545K), Q546X (Q546E, Q546K, Q546L a Q546R) v exonu 9 a M1043I, H1047X (H1047L, H1047R, H1047Y) a G1049R v exonu 20, když je procentní mutace 5% nebo vyšší. Detekce mutace se děje pomocí PCR analýzy na analyzátoru cobas® z 480. V každém cyklu probíhá kontrola mutace a negativní kontrola za účelem potvrzení platnosti cyklu. Pro detekci mutací zacílených v tomto testu jsou použity čtyři různá reportovací barviva. Amplifikace cílových sekvencí PIK₃CA je detekována nezávisle v průběhu tří reakcí a to měřením fluorescence na čtyřech charakteristických vlnových délkách optických kanálů.

Z jedné soupravy cobas® PIK₃CA mutačního testu lze vyšetřit 24 vzorků při minimální velikosti běhu 3 vzorky. K dispozici jsou činidla pro 8 běhů po 3 vzorcích plus kontroly. Mutační kontrola (PIK3CA MC) a Negativní kontrola musí být zahrnuty v každém běhu. Vyhodnocení výsledků provádí řídicí software plně automaticky a výsledky jsou k dispozici za méně jak 8 hodin od začátku izolace DNA z FFPET řezu.

Platinum-based chemotherapeutic drugs as effective sensitizers of colon and prostate cancer cells to the apoptotic action of TRAIL

Jelínková Iva^{1,2}, Bujoková Barbora^{1,2}, Vondálová Blanářová Olga^{1,2}, Sova Petr³, Hofmanová Jiřina^{1,2}, Kozubík Alois^{1,2}, Hyršlová Vaculová Alena¹

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Brno, Czech Republic

²Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Platinum Pharmaceuticals a.s., Brno, Czech Republic

Platinum-based chemotherapeutic drugs such as cisplatin or oxaliplatin are used in therapy of various solid tumors, but their application is limited due to acquired/inherited cancer cell resistance and serious side effects to normal tissues. A novel platinum (IV) adamantylamine ligand-containing complex LA-12 has been introduced and shown as highly effective in elimination of several cancer cell types including those resistant to cisplatin. Our previous and current work highlighted the abilities of LA-12 to trigger colon cancer cell death (apoptosis) in significantly lower doses compared to cisplatin or oxaliplatin, and independently on the cell confluency

or p53 status. In addition, we were the first to demonstrate that compared to cisplatin, LA-12 can act as a more effective sensitizer of colon and prostate cancer cells to apoptosis induced by TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand), a unique cytokine with promising anticancer potential.

We examined and compared the molecular mechanisms of the individual action of the conventionally used and novel platinum-based drugs as well as their ability to substantially contribute to the enhancement of TRAIL-induced apoptosis in several human colon and prostate cancer cell lines. The stimulation of apoptotic response following the LA-

12/cisplatin + TRAIL combination was demonstrated at the level of TRAIL death receptors and/or mitochondria. The results of our detailed molecular investigations, especially focused on the mechanisms of caspase activation and the role of selected Bcl-2 family proteins will be presented in our contribution, and the potential therapeutic targets and the relevance of the drug application in cancer treatment will be discussed.

This work was supported by the IGA of the Ministry of Health of the Czech Republic (NT 11201-5) and Czech Science Foundation No. P301/11/1730.

Epstein-Barr Virus and Lymphomagenesis

Flodr Patrik¹, Tichý Martin¹, Murray Paul²

¹Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc and Faculty Hospital Olomouc, Czech Republic

²CRUK Institute for Cancer Studies, School of Medicine, University of Birmingham, UK

The role of EBV in lymphomagenesis is crucial. During EBV infection linear virus genome become circular and persists as an episome. Viral genome can express proteins of lytic or latent cycle. In latent cycle limited set of genes are expressed EBNA1, LMP1, LMP2. LMP1 is transforming protein, acts as protooncogene, as constitutively activated member of TNFR superfamily mimic CD40 and upregulates expression of CD23, CD40, BCL2 and NfκB. LMP2 blocks

direct role in EBV oncogenesis (PTLD, HIV ass. lymphomas), high-level expression of all immunodominant latency proteins is detected. Type I, II plays cofactor's role in EBV oncogenesis and is usually detected in immunocompetent individuals (BL, CHL, primary effusion DLBCL, AILT, ENK/T-cell lymphoma nasal type, Enteropathy-type T-cell lymphoma). In HL the virus genome express type II of latency virus proteins - EBNA1, LMP1, LMP2. LMP1 is transforming protein, acts as protooncogene, as constitutively activated member of TNFR superfamily mimic CD40 and upregulates expression of CD23, CD40, BCL2 and NfκB. LMP2 blocks

tyrosin kinase phosphorylation and prevents reactivation of EBV. EBNA-1 maintains EBV genome as episome. The deregulated expression of particular proteins in EBV transformed lymphoid cells could be important for EBV-driven lymphomagenesis and also for challenge in new therapeutic approach - infusion autologous EBV-specific T-lymphocytes, use of nucleoside analogue, proteasome inhibitor bortezomib or Bcl-2 inhibitor (HA14-4).

Acknowledgements:

MSM 6198959205, IGA NT11103 and Leukemia and Lymphoma Research Fund.

Secondary mutations in C-KIT in GIST occurring after therapy with imatinib

Berkovcova J.¹, Jirikovska H.¹, Krejci E.¹, Kocakova I.², Sirotek L.³, Machackova E.⁴, Fabian P.¹

¹ Masaryk Memorial Cancer Institute, Dept. of oncological and experimental pathology

² Masaryk Memorial Cancer Institute, Dept. of clinical oncology

³ Masaryk Memorial Cancer Institute, Dept. of surgical oncology

⁴ Masaryk Memorial Cancer Institute, Dept. of epidemiology and cancer genetics

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are rare mesenchymal tumors. They are characterized by a strong tyrosinase receptor C-kit expression (CD 117), which is the most important immunohistochemical marker. Along with its high expression activating mutations in C-KIT gene are detected. Approximately 5-10% of GIST do not express C-kit, they display more frequently mutations in PDGFR α gene, which also encodes the C-kit related tyrosine kinase receptor type III. To determine the mutation status of C-KIT and PDGFR α genes we have introduced a direct sequencing method of the most frequently mutated exons. Treatment of GIST is based on primary resection. For the treatment of inoperable or metastatic disease there are two biological agents: imatinib (Glivec) and sunitinib (Sutent) in the Czech Republic.

Imatinib is indicated in patients with C-kit positive GIST. Sunitinib is used in patients in whom treatment with imatinib has failed due to resistance or intolerance. We report a case report of a patient with histologically confirmed GIST with a high risk for aggressive behavior, C-kit positive. The patient was after total exision. The metastases in the liver were observed. Then she was deployed targeted biological therapy (Glivec 400 mg / day). After a month of therapy was reported a partial regression of disease, which further progressed to induce stabilization of residual liver metastases. After a four year period of stable disease, a new tumor in a stomach wall was detected by CT scans. A surgical revision was indicated, leading to a resection of two tumors in a stomach wall and a near adipose tissue. The first one was evaluated as GIST with a high risk of aggressive behavior by a

pathologist. The second one affecting the adipose tissue was characterised by hypocellularity with weak C-kit positivity. Molecular examination of both samples showed the presence of a large deletion mutation in exon 11 of the C-KIT gene (p.Trp557_Gln575del19), the same mutation was subsequently found from the initial biopsy of liver metastases obtained before the deployment of targeted therapy. Furthermore, in the new GIST focus a secondary point mutation in exon 17 of the C-KIT gene (p.Cys809Gly) was detected, which was not found in the original liver biopsy. In our presentation we want to demonstrate the importance of multidisciplinary collaboration with the oncologist, surgeon and molecular biologist, pathologist in the diagnosis and especially individual approach to patients.

Posters

1) Přehled primárních a sekundárních mutací s ohledem na význam detekce primární a sekundární rezistence u pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem

Augustiňáková A., Hilská I., Krsková L., Kalinová M., Břízová H., Fejfarová J., Šmídová O., Forejtová V., Kodet R.

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN v Motole

Gastrointestinální stromální tumory (GISTy) patří mezi nejčastější mezenchymální nádory gastrointestinálního traktu. Morfologicky, imunofenotypově i geneticky jsou GISTy definovanou skupinou nádorů, odlišnou od jiných nádorů měkkých tkání lokalizovaných v gastrointestinálním traktu, s charakteristickou expresí transmembránového proteinu KIT (CD 117). Aktivační (gain of function) mutace v genech KIT a PDGFRA (platelet derived growth receptor factor alpha), jenž kódují receptorové tyrosinkinázy KIT a PDGFRA, hrají v patogenezi vzniku GISTů významnou roli. Mutacemi podmíněná konstitutivní aktivace transmembránových proteinů KIT a PDGFRA vede k následnému, na ligandu nezávislému, spuštění signálních drah podporujících proliferaci a prodloužené přežívání nádorových buněk. Ve všech analyzovaných případech se jednalo o mutace se zachováním čtecího rámce. Spektrum detekovaných mutací zahrnuje jednak jednoduché substituce a delece nukleotidů stejně jako složitější delece a inserce nukleotidů, inverze nebo interní tandemové duplikace. Největší variabilita detekovaných mutací je analyzována v exonu 11 genu KIT.

Terapií první volby je u operabilních GISTů jejich chirurgické odstranění. Pro léčbu metastazujících, neresekovatelných a recidivujících GISTů je v současné době jako lék volby indikován imatinib mesylát (IM). Imatinib mesylát je ATP analogem, který selektivně inhibuje aktivované tyrosinkinázy KIT, PDGFRA, PDGFRB, ABL, BCR-ABL a ARG. Pro efektivní a účinnou biologickou léčbu je důležitým poznatkem rozdílná senzitivita nádorů na terapii. Senzitivita (citlivost/rezistence) nádoru na imatinib mesylát u pacientů s GISTem podle doposud provedených klinických studií souvisí s mutačním stavem genů KIT a PDGFRA ve vztahu k přítomnosti mutací v určitém exonu. Mimo nádorů citlivých, případně méně rezistentních byla zjištěna přítomnost mutací vedoucích k primární rezistenci nádorů. U části pacientů dochází v průběhu terapie IM ke změně senzitivity nádoru ve smyslu vzniku sekundární rezistence. Získaná sekundární rezistence vzniká v průběhu terapie, často na podkladu vzniku sekundárních mutací.

V rámci mutační analýzy genů pro receptorové tyrosinkinázy KIT a PDGFRA jsme vyšetřili 175 vzorků od 160 pacientů. Nejčastěji jsme ve shodě s literárními údaji zjistili přítomnost

mutací v exonu 11 genu KIT. Mutace v exonu 11 genu KIT jsou obecně spojeny s citlivostí na cílenou terapii IM. Zjistili jsme rovněž přítomnost mutací, u kterých je známa nižší senzitivita na terapii. Ve 13 případech z 20 detekovaných v exonu 18 genu PDGFRA jsme detekovali přímo substituční mutaci v kodonu 842, která vede k primární rezistenci nádoru na terapii. Sekundární mutace jsme zjistili u 7 pacientů, primárně odpovídajících na cílenou terapii IM. U části těchto pacientů jsme měli k dispozici několik vzorků. V jednom případě jsme ve třech dostupných vzorcích od jednoho pacienta detekovali 3 rozdílné sekundární mutace. Celkově jsme sekundární mutace detekovali ve 12 případech.

Screening mutačního stavu, s ohledem na potvrzenou prediktivní hodnotu přítomnosti mutací v jednotlivých exonech a odpovědí nádoru na cílenou biologickou terapii, může být využíván pro posouzení senzitivity nádorů k inhibitorům aktivovaných tyrosinkináz. Určení a ozřejmění přítomnosti mutací zodpovědných za primární rezistenci na terapii nebo sekundárních mutací zodpovědných za získanou rezistenci může přispět k posouzení terapie a volbě účinnějšího terapeutika.

Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN Motol).

2) Specific conditions of tumor microenvironment enhance cytotoxicity of disulfiram, tetrathiomolybdate and wedelolactone to breast cancer and neuroblastoma cells

Beneš P.^{1,2}, Navrátilová J.¹, Hankeová T.¹, Nehybová T.¹, Knopfová L.^{1,2}, Šmarda J.^{1,2}

¹Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Masaryk Memorial Cancer Institute, RECAMO, Brno, Czech Republic

Microenvironment of solid tumors exhibit several features that are not found in corresponding normal tissues. Ability of the malformed tumor vasculature to deliver nutrients and remove waste products is badly compromised resulting in hypoxia and acidosis. These specific features of the tumor microenvironment can reduce the effectiveness of numerous chemotherapeutics. Hypoxia, acidosis and supply of nutrients can be manipulated in vitro and in vivo to provide more favorable conditions for effective chemotherapy.

Our study was designed to analyze the effect of hypoxia, acidosis and limited glucose supply to cytotoxicity of disulfiram, tetrathiomolybdate and wedelolactone to breast

cancer and neuroblastoma cells. We found that cytotoxicity of these drugs can be strongly enhanced by manipulating tissue culture conditions that simulate the character of tumor microenvironment. We believe that information about cytotoxicity of newly developed/tested chemotherapeutics in conditions of specific tumor microenvironment can be helpful for improvement of treatment strategies and provide further benefit for cancer patients.

This work was funded by the NT 13441–4/2012 grant of the Internal Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic, and by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) via the human resources project „IntegRECAMO: Intellectual Anchor“ (CZ.1.07/2.3.00/20.0097).

3) Imunohistochemická analýza exprese proteínu AGR3 a mukopolysacharidů u cholangiocelulárního a hepatocelulárního karcinomu

Brychtová V.¹, Žampachová V.², Hrstka R.¹, Němeček R.³, Fabian P.⁴, Hermanová M.², Vojtěšek B.¹

¹RECAMO, Masarykův onkologický ústav, Brno

²Patologicko-anatomický ústav, LF MU a FN u sv. Anny v Brně

³Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴Oddělení patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Protein AGR3 je transmembránový protein jehož zvýšená exprese byla doposud demonstrována v souvislosti s tumorigenezí prsu, prostaty a ovaríí. V naší studii jsme se zaměřili na možnosti využití proteínu AGR3 jako potenciálního diagnostického markeru u cholangiocelulárního (CC) a hepatocelulárního (HCC) karcinomu. Přes výraznou histologickou podobnost obou malignit je strategie jejich léčby výrazně odlišná. Přesná diagnostika je tedy zásadní, často však poměrně komplikovaná.

Imunohistochemická analýza zdravé tkáně prokázala expresi AGR3 v cholangiocytech intrahepatálních žlučodů ve srovnání s jaterními hepatocyty. Následně vyšetřovaný materiál zahrnoval 50 vzorků HCC, 30 vzorků CC a jeden případ duálně diferencovaného CC-HCC. Exprese AGR3 byla v případech HCC převážně negativní na rozdíl od silné exprese u vzorků původem z cholangiocelulárního karcinomu. Exprese proteínu AGR3 výrazně korelovala se sekrecí kyselých mucinů, naopak negativní korelaci vykazovala exprese membránového proteínu Glypican-3, běžně používaného diagnostického markeru HCC.

Z našich výsledků vyplývá, že exprese proteínu AGR3 je poměrně specifická pro CC a je potenciálně spjatá s mukosekrecí. Avšak využití exprese AGR3 pro diferenciální diagnostiku HCC a CC je z důvodu výrazné nehomogenity imunoprofilu HCC pouze omezené.

Tato práce byla podpořena grantovým projektem GACR P206/12/G151, IGA NT/13794–4/2012 a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

4) Spatio-temporal distribution of CYP P450 Epoxygenases in human embryos: importance for prenatal development

Čížková K.

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

CYP epoxygenases (CYP2C and CYP2J subfamilies) convert arachidonic acid into four regioisomeric eicosatrienoic acids (EETs), biologically active molecules involved in mitogenesis and cell signalling. CYP epoxygenases seem to play a role in proper prenatal development in humans, although our knowledge is far from complete. We investigated spatio-temporal expression pattern of CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2J2 in human embryonic/foetal intestine, liver and kidney by immunohistochemistry. Distribution of CYP epoxygenases expression in particular organs correlate with changes in prenatal development, which could support hypothesis that EETs might act as morphogen.

5) Rôzna úroveň exprese proteínu CA IX a intenzity signálu CA9 génu v medulárnom karcinóme štítnej žľazy s ohľadom na prognózu pacienta

Feketeová L.¹, Janega P.^{1,2}, Babál P.¹

¹Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská republika

²Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Karbonická anhydráza (CA) umožňuje svojou aktivitou udržiavať stabilné pH v mikroprostredí nádorových buniek, čím napomáha ich deleniu a šíreniu aj v nepriaznivých podmienkach hypoxie. Hypoxické prostredie, spôsobené najmä rastom nádorovej hmoty, vedie k aktivácii transkripčného faktora HIF1 α a prepisu jeho cieľových génov, tiež génu pre CA9. Medulárny karcinóm štítnej žľazy (MTC) je malígný nádor pochádzajúci z parafolikulárnych C buniek produkujúcich hormón kalcitonín. Vyskytuje sa ako sporadický nádor, familiárna forma a tiež ako súčasť syndrómu mnohopočetnej endokrinnnej neoplázie typu 2. Neliečený vytvára metastázy v lymfatických uzlinách krku a vzdialené v mozgu, kostiach a pečeni. V mnohých prípadoch je rezistentný voči rádio- a che-

moterapii. Na základe rozdielnej expresie proteínu karbonickej anhydrázy IX v MTC so zlou a dobrou prognózou sa uvažuje nad jeho využitím v prediktívnej diagnostike týchto nádorov. CA IX má potenciál stať sa aj cieľovou molekulou biologickej protinádorovej terapie.

Metodika: Analyzovali sme 46 archívnych vzoriek tkaniva s MTC. Rezy boli farbené imunohistochemicky s použitím monoklonálnej protilátky proti CA IX (klon M75), paralelne bola z parafínových rezov izolovaná mRNA na kvantitatívnu PCR analýzu miery expresie génu CA 9. Získané údaje boli vyhodnotené štatisticky použitím nepárového t testu.

Výsledky: Pozitivita proteínu CA IX bola pozorovaná v 89% (41/46) MTC. Spomedzi pacientov so zlou prognózou bola silná a stredná intenzita expresie proteínu pozorovaná v 85% (11/13) prípadov. Rozdiel v proteínovej expresii bol signifikantný na základe použitia nepárového t testu. V tejto skupine pacientov však bola nižšia miera prepisu génu (hladina nameraných Ct hodnôt) v porovnaní so skupinou s dobrou prognózou, kde sme pozorovali opačný trend (slabá expresia proteínu a silnejšia expresia génu). Tento rozdiel však štatisticky signifikantný nebol.

Diskusia: V súbore MTC so zlou prognózou sa profiluje skupina nádorov so silnou pozitívitou proteínu pri nízkych delta Ct hodnotách, ktoré dokumentujú prepis skúmaného génu. Pri porovnateľných hodnotách delta Ct sú významné rozdiely v expresii proteínu medzi skupinami. Nádory so zlou prognózou majú silnú expresiu proteínu, v skupine s dobrou prognózou pri rovnakých hodnotách delta Ct zisťujeme nízku mieru expresie prípadne negatívu proteínu. Možným vysvetlením rozdielov medzi expresiou proteínu a signálu na úrovni mRNA je spätná inhibícia prepisu génu zapríčinená vysokou hladinou proteínu v tkanive. Týmto spôsobom by bolo možné objasniť výsledky v nádoroch s dobrou prognózou, kde sme pozorovali vysokú hladinu prepisu génu (delta Ct hodnotu) a veľmi slabú expresiu proteínu, prípadne negatívu v nádorovom tkanive (Chen et al. 2002). MTC so slabým signálom na úrovni mRNA a silnou expresiou proteínu v tkanivách so zlou prognózou a opak, skupina so slabou expresiou proteínu v tkanivách s dobrou prognózou pri rovnakých delta Ct hodnotách by mohla byť spôsobená odlišným mechanizmom translácie v rôznych bunkách. Táto skutočnosť by mohla naznačovať vyššiu životaschopnosť buniek nádorov so zlou prognózou. Pri týchto nádoroch sa predpokladá vyššia agresivita buniek, keďže sú schopné nielen prežiť všetky zmeny v mikroprostredí počas transformácie tkaniva, ale sa v tomto prostredí aj šíriť. Zdá sa, že bunky v nádoroch s dobrou prognózou, kedy nevytvárajú metastázy, podliehajú odlišnému mechanizmu translácie génu pre karbonickú anhydrázu IX a spomínaného proteínu sa tvorí menšie množstvo v porovnaní s nádormi tvoriacimi vzdialené metastázy a teda s agresívnejším charakterom.

Chen G.: 2002. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1:304–313

6) Detekcia mutácií BRAF génu vo wild type GISToch

Gemzová K., Buzalková V., Minárik G., Plank L., Lasabová Z.

Ústav molekulovej biológie JLF UK a UNM, Vrútky, Slovenská republika

Úvod: GISTy, a teda gastrointestinálne stromálne nádory reprezentujú najčastejšie mezenchymálne nádory gastrointestinálneho traktu. Priemerný vek výskytu tohto ochorenia u ľudí je 60 rokov $\pm$ 10 rokov. Postihuje obe pohlavia rovnako. Pochádzajú z intersticiálnych Cajalových buniek mutáciou v dvoch génoch kódujúcich bunkové receptory. Napriek klinickopatologickým rozdielom, GISTy nesú onkogénnu mutáciu v KIT alebo PDGFRa géne. Tieto mutácie znižujú apoptózu a vedú k ligand-nezávislej aktivácii a signálnej transdukcii tyrozín-kinázových receptorov KIT a PDGFRa, čo zvyšuje proliferáciu nádorových buniek. Mutácie exónov 9,11,13,17 KIT génu a exónov 12,14,18 PDGFRa génu tvoria asi 85% všetkých prípadov GISTov. Vzhľadom na to, že u zvyšných 15% GISTov stále nepoznáme genetickú podstatu (tzv. wild-type GISTy), je potrebné hľadať stále nové diagnostické biomarkery, ktorých mutácie by mohli byť zodpovedné za vznik ochorenia. Na základe wild type genotypu sa nedá predpokladať malígny potenciál, typická lokalizácia či veľkosť nádoru, ale je s ním spojená zlá odpoveď na inhibítory tyrozín-kináz (imatinib). Súčasné štúdie poukazujú čoraz viac na úlohu ďalšieho protoonkogénu v tumorigenéze GISTov. B-RAF proteín je serín-treonín proteín kináza, ktorá je dôležitým efektorom RAS aktivácie, a preto je zahrnutá RAS-BRAF-ERK signálnej dráhy, ktorá je kritická pre transkripčnú reguláciu. Z tohto dôvodu predpokladáme, že mutácie B-RAF génu majú významnú úlohu pri vzniku WT-GISTov.

Metodika: Naša štúdia pozostáva zatiaľ zo 43 formalínom fixovaných, v parafíne ukotvených vzoriek nádorového tkaniva extrahovaných z rôznych častí gastrointestinálneho traktu. Pacienti boli vo veku 43–68 rokov. Všetky vzorky boli KIT a PDGFRa negatívne. DNA sme izolovali z 2–5 parafínových rezov o hrúbke 5 μ m. Primery sme navrhli na amplifikáciu exónu 15, pretože mnohé mutácie boli detegované práve v exóne 15. Vzorky sme sekvenovali pomocou dideoxysekvenácie podľa Sangera. „Hotspot“ miestom exónu 15 je mutácia V600E (1799 T A).

Výsledky: B-RAF mutáciu sme detegovali len v jednom prípade zo 43 vzoriek. Mutácia sa vyskytla v blízkosti „hotspot“ miesta. Vzorka pochádzala z rektálneho nádoru s vysokou mitotickou aktivitou. Tumor patril do skupiny s vysokým rizikom malígneho správania.

Diskusia: V porovnaní s publikovanými prácami sme našli signifikantne nižšiu frekvenciu B-RAF mutácií. Jedným z dôvodom môže byť práve zvolená metóda sekvenovania. Kým pri detekcii KIT a PDGFRa mutácií je dideoxysekvenácia postačujúca, pri detekcii B-RAF mutácií odporúčame zvoliť senzitívnejšiu metódu.

Záver: B-RAF mutácie majú významnú úlohu pri patogeneze wild-type GISTov, napriek tomu, že sú pomerne málo preštudované. Štúdia potvrdzuje potrebu rozšírenejšieho genetického testovania wild-type GISTov hlavne z dôvodu ich horšej odpovede na liečbu inhibítormi tyrozín-kináz.

7) Detekcia MPL mutácií u JAK2 negatívnych pacientov

Gemzová K., Burjanivová T., Marcinek J., Marlen Fossan Aas, Plank L., Lasabová Z.

Ústav molekulovej biológie JLF UK a UNM, Vrútky, Slovenská republika

Úvod: Polycythemia vera (PV), esenciálna trombocytóza (ET) a primárna myelofibróza (PMF) patria do skupiny Ph1 negatívnych myeloproliferatívnych neoplazií (MPN), pri ktorých sa často vyskytuje mutácia JAK2V617F. Tato mutácia sa vyskytuje takmer u všetkých pacientov s PV a u približne 60% pacientov s ET a PMF. V diferenciálnej diagnostike MPN však význam tejto mutácie stále nie je dostatočne objasnený. Jednou z ďalších mutácií, ktoré sa vyskytujú iba u pacientov s ET a PMF, sú mutácie génu MPL, kódujúceho trombopoetínový receptor. Najčastejšia mutácia je MPL –W515L/K, nájdená však iba u 5% JAK2 negatívnych pacientov. Trombopoetín a jeho receptor MPL je nevyhnutný pre prežívanie a diferenciáciu hematopoetických kmeňových buniek a spolu tvoria kľúčový regulačný faktor pre vývin megakaryocytov a tvorbu krvných doštičiek. U pacientov s MPN dochádza k zníženej expresii MPL v dôsledku chybné posttranslačnej modifikácie.

Metodika: Do dnešného dňa sme vyšetřili 80 vzoriek kostnej drene od pacientov s klinicky verifikovanou ET a PMF. Vzorky boli fixované formalínom a ukotvené v parafínovom bločku. Nami implementovaná metodika detekcie mutácie MPL z parafínových bločkov umožnila analýzu veľkého množstva archívneho materiálu pre retrospektívne štúdie. Použitie parafínových bločkov však so sebou prinieslo viaceré komplikácie, ale po ich odstránení sa nám podarilo osekvenovať všetkých 80 vzoriek. Použili sme primery umožňujúce amplifikáciu celého exónu 10. Proces amplifikácie prebiehal pomocou touch-down PCR. Vzorky sme sekvenovali využitím dideoxysekvenácie podľa Sangera.

Výsledky: MPL mutáciu sme detekovali len v jednom prípade z 80 vzoriek. V druhom prípade zmeny sekvencie bol prítomný polymorfizmus. Mutácia W515K, ktorú sme identifikovali, sa vyskytuje približne u 5% pacientov s PMF a ET.

Diskusia: Vzhľadom na počet vyšetrených vzoriek, musíme konštatovať, že počet detegovaných mutácií je príliš nízky. Avšak vzhľadom na zriedkavosť mutácií MPL receptora u Ph- negatívnych pacientov v populácii, je nízky zachyt mutácií prirodzený. Druhým radikálnejším dôvodom takého nízkeho počtu mutácií sa javí zvolená metóda sekvenácie, preto by sme odporúčali iné metódy ako je napr. pyrosekvenovanie či next generation sequencing.

Záver: Význam mutovaného MPL receptora, a teda aberantne glykozylovaného je v MPN ochoreniach stále nejasný. Prognostický význam mutácií a ich prínos v patogeneze MPN sa očakáva v blízkej budúcnosti. Rozdiel medzi zachytením MPL mutácií pomocou Sangerovho sekvenovania a next generation sequencing je značný a je možné, že aj v našom súbore je v skutočnosti tých mutácií oveľa viac. Objavili sa práce, ktoré dokazujú veľké rozdiely v zachytení mutácií MPL génu. V budúcnosti by sme chceli preto naše vzorky analyzovať skôr inou metodikou ako je pyrosekvenovanie alebo next-generation sequencing, ktoré sú asi na túto analýzu vhodnejšie a senzitívnejšie.

8) Kostní dřeň – zkušenosti z pohledu laboratorního pracovníka

Hrabovská L., Broklová I.

CGB laboratoř a.s., Ostrava

Základní informace o kostní dřeni, proč kostní dřeň vyšetřujeme, odběr, nemoci, zpracování kostní dřene a používaná barvení v naší laboratoři.

9) Studium interakcí lidského prionového proteinu (PrPC) s kovy (Cu, Zn) a metalothioneinem

Cardová A.¹, Šobrová P.¹, Vaculovičová M.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}, Adam A.^{1,2}

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita v Brně

²Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Brno

Prionová onemocnění, nazývaná také transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE), jsou fatální neurodegenerativní onemocnění, která mohou ovlivnit jak člověka, tak široké spektrum zvířat. Choroby způsobené priony se projevují prostřednictvím morfologických a patofyziologických změn, které jsou spojovány i s dalšími progresivními encefalopatiemi, jako je například Alzheimerova či Parkinsonova choroba. Tato onemocnění ovlivňují centrální nervový systém a jsou výsledkem konformačních změn prionového proteinu z jeho přirozené buněčné formy (konformace α -šroubovice, PrP^C) na infekční formu (β -skládaný list, PrP^{Sc}). K patogenezi prionového onemocnění může přispět i nedostatek železa či nerovnováha kovů, jako je měď či zinek v mozku a jimi ovlivněná antioxidantní funkce PrP^C. Homeostázi iontů kovů obvykle zajišťuje celá řada proteinů, které regulují jejich správnou funkci. Porucha homeostázy může vyústit v závažné patologické změny včetně neurodegenerativního onemocnění. Významný protein, který hraje klíčovou roli pro udržení homeostázy těchto kovů, se nazývá

metallothionenin (MT), který je specifický velkým množstvím aminokyselin bohatých na cystein. Právě díky svým thiolovým skupinám dokáže MT vázat ionty kovů a tím regulovat jejich množství. Podrobné porozumění homeostáze iontů kovů tak jako detailní přehled jejich transportu a jejich interakce s biomolekulami může být zásadní pro pochopení normálních a patologických procesů vyskytujících se u živých organismů. 2. Hlavním cílem naší práce bylo sledování elektrochemického chování prionového proteinu PrP^C a jeho interakce s různými kovy, jako je měď a zinek. Dále jsme se věnovali sledování interakcí prionového proteinu s metallothioneinem a sledování jejich vzájemné role v procesu homeostázy kovů. Pro tyto účely byla využita elektrochemická metoda diferenční pulzní voltametrie ve spojení s adsorptivní přenosovou technikou. Pomocí této metody lze odhalit, zda dochází mezi proteinem a kovy (poté mezi proteinem a proteinem) ke specifické interakci, a tím pádem zda má přítomnost kovů nějaký vliv na chemickou strukturu prionového proteinu. Nejprve byly získány elektrochemické záznamy obou proteinů jak PrP^C, tak metallothioneinu. V dalším kroku byly detekovány samostatně oba sledované ionty kovů. Poté byly sledovány interakce prionů a kovů a nakonec prionů a metallothioneinu. Změny v intenzitě signálů či splynutí signálů apod. pak poukazují na to, že spolu látky způsobem interagují. Specifické změny jsme zaznamenali ve všech případech, z čehož vyplývá, že prionový protein interaguje a tvoří komplexy jak s mědí a zinkem, tak s metallothioneinem.

Poděkování: Autoři by rádi poděkovali za finanční podporu projektům CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068, DP04_2012 a DOC CEITEC.01/2012.

Literatura

1. Sobrova P, et al. Electrochemical Behaviour of Native and Denatured beta-Sheet Breaker Prion Protein. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012; 7: 928–942.
2. Krizkova S, et al. Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy. *Drug Metab. Rev.* 2012; 44: 287–301, doi: 10.3109/03602532.2012.725414 (2012).

10) Microenvironment-dependent function of c-Myb in breast cancer: the focus on the tumor-endothelial cell interactions

Knopfová L.^{1,2}, Beneš P.^{1,2}, Hermanová M.³, Masařík M.⁴, Šmarda J.^{1,2}

¹Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

²Masaryk Memorial Cancer Institute, RECAMO, Brno, Czech Republic

³First Department of Pathological Anatomy, St. Anne's University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Deregulation of the c-Myb transcription factor, the stem/progenitor cell regulator, occurs frequently in breast cancer and other malignancies. The ambivalent function of c-Myb in breast tumors has been reported. We described that the MYB overexpression in breast carcinoma cell lines can differentially affect cell migration and invasion in vitro depending on chemotactic/chemokinetic conditions and matrix composition. The Myb-overexpressing mammary tumors in syngeneic BALB/c model rarely metastasized to lungs in contrast to control tumors, though the formation of the bone and liver metastases was not affected. The selective disadvantage of these cells in lung colonization might result from their inability to penetrate a vessel wall and underlying basement membrane in lung parenchyma. We therefore targeted the specific aspects of tumor-endothelial cell interactions and demonstrated that capacity of transendothelial migration of the MYB-overexpressing MDA-MB-231 cells was impaired. The differential regulation of cytoskeleton dynamics and suppression of interstitial collagenase may contribute to the damaged extravasation and site-selective metastases of the MYB-overexpressing breast tumors.

This work was funded by grant grant NT 13441–4/2012 of the Internal Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic, and by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) via the human resources project "IntegRECAMO: Intellectual Anchor" (CZ.1.07/2.3.00/20.0097).

11) Expresní analýza genů zapojených v patogenezi rabdomyosarkomů

Krsková L., Mrhalová M., Hilská I., Fejfarová J., Šmídková O., Kodet R.

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF a FN Motol, Praha

Rabdomyosarkomy jsou nejčastějšími nádory měkkých tkání dětského věku. Rabdomyosarkomy dětského věku se vyskytují ve dvou základních variantách: alveolární (aRMS) a embryonální (eRMS).

V rámci studie jsme provedli absolutní kvantifikaci fúzních genů (PAX3-FKHR a PAX7-FKHR) a genů zapojených do patogeneze RMS (MyoD1, Myogenin, Igf2, Egfr a telomerázové katalytické podjednotky hTERT). Vyšetřili jsme 118 pacientů s diagnózou RMS a kontrolní skupinu vzorků. Detekce fúzních genů vyvolaných translokací představují vhodný marker pro sledování minimální diseminované nemoci, popř. okrajů excize u pacientů s fúzně pozitivním aRMS.

Sledovali jsme roli imprintovaného genu Igf2 v patogenezi RMS. Zjistili jsme, že exprese genu Igf2 hraje roli v patogenezi RMS. Hladina mRNA Igf2 byla u RMS signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny ($p=0.0001$). Nepozorovali jsme rozdíl v hladině exprese Igf2 mezi eRMS a aRMS.

Zjistili jsme stonásobně vyšší hladinu Igf2 mRNA u RMS oproti zdravé svalové tkáni. Zjistili jsme vysokou hladinu Igf2 mRNA u RMS v korelaci s hladinou mRNA pro MyoD1a pro Myogenin. Tento nálezn je pravděpodobně způsoben tím, že MyoD1 a následně i Myogenin jsou cílovými geny IGF2 dráhy, a to jak u aRMS, tak i eRMS.

Dále jsme se zaměřili na sledování hladin exprese genů pro receptor pro epidermální růstový faktor EGFR a dále pak pro katalytickou podjednotku telomerázy hTERT.

V normálních somatických buňkách se telomery zkracují během života buňky při každé replikaci a telomeráza není v těchto buňkách detekovatelná. V kontrastu s tím mají germinální a fetální buňky vysokou telomerázovou aktivitu a telomera si zachovává svoji délku nezávisle na počtu dělení. Aktivita telomerázy – enzymu, který prodlužuje telomery, je zodpovědná za imortalizaci buněk během embryonálního vývoje, za imortalizaci kmenových buněk, buněk reprodukčních orgánů, ale zároveň i buněk nádorových. Telomeráza jako enzym se skládá ze 3 základních komponent: komponenta RNA polymerázy (hTERC), s telomerázou asociovaný protein (TEP1) a telomerázová katalytická podjednotka (hTERT).

V naší studii jsme se zaměřili na sledování aktivity telomerázy u pacientů s RMS, proto jsme aplikovali relativní kvantifikaci pomocí RQ-RT-PCR katalytické podjednotky hTERT u 93 vzorků RMS (49 alveolárních a 44 embryonálních RMS). Výsledky jsme srovnávali s kontrolními skupinami jiných mesenchymálních nádorů, dále pak s nádory mléčné žlázy, non-Hodgkinskými lymfomy a neposledně se zdravou svalovou tkání.

Hladina mRNA hTERT byla u rhabdomyosarkomů signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny ($p=0.0001$). Dále jsme pozorovali signifikantní rozdíl v hladině exprese hTERT mezi oběma skupinami RMS – vyšší hladina byla detekována u alveolární varianty; u embryonální varianty byla hladina hTERT mRNA nižší. Hladina mRNA hTERT nekorelovala s věkem nemocných, s jejich pohlavím ani s přežitím pacientů.

Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) je transmembránový receptor, který ovlivňuje buněčnou proliferaci a růst. Navázáním aktivujících ligandů (EGF) na extracelulární doménu receptoru indukují homo- či heterodimerizaci receptoru, následnou autofosforylaci a aktivaci signální dráhy. Deregulace EGFR je popisována především u epitelálních tumorů, což z něj činí dobrý cíl pro protinádorovou terapii. V současné době jsou k dispozici dva druhy terapie cílené na EGFR. Jednak tyrosinkinázové inhibitory zabírající fosforylaci intracelulární katalytické domény EGFR, mezi něž patří gefitinib a erlotinib používané zejména v terapii plicních karcinomů, jednak anti-EGFR monoklonální protilátky jako cetuximab a panitumumab, které se váží na extracelulární doménu EGFR, a zabírají tak vazbu ligandu. Vyšetření hladiny exprese, popř. amplifikace genu EGFR může posloužit k odhadu úspěšnosti léčby pomocí výše zmíněných inhibitorů EGFR.

Hladina mRNA EGFR byla u rhabdomyosarkomů signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny ($p=0.0001$). Dále jsme pozorovali signifikantní rozdíl v hladině exprese EGFR mezi oběma skupinami RMS – vyšší hladina byla detekována u embryonální varianty. Podobný obraz jsme pozorovali při imunohistoche-

mickém barvení receptoru EGFR, kdy u eRMS dominovala silná difúzní pozitivita, na rozdíl od aRMS, kde přes pozitivitu mRNA EGFR jsme zvláště u fúzně pozitivních pacientů pozorovali negativní výsledky imunohistochemického barvení. Hladina mRNA EGFR nekorelovala s věkem nemocných, s jejich pohlavím, ani s generalizací nádoru v době diagnózy, či lokalizací primárního nádoru. Signifikantní rozdíl vyšší hladiny mRNA pro EGFR jsme zaznamenali v souvislosti s přežitím pacientů a s přežitím pacientů bez známek onemocnění, což dáváme do souvislosti s obecně lepší prognózou pacientů s eRMS a jejich delším obdobím bez známek nemoci.

Z dosažených výsledků sledování exprese genu EGFR je patrné, že u případů, kde je detekována silná pozitivita imunohistochemického barvení EGFR, lze této vlastnosti nádorových buněk využít k terapii pomocí výše zmíněných inhibitorů EGFR, zvláště pak u pacientů, u kterých došlo k selhání léčby.

Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL).

12) Activated inflammatory cells in human atrial myocardium from patients with atrial fibrillation

Kučera T.¹, Smorodinova N.¹, Cohen-Addad D.¹, Ben-David Ch.¹, Přidal J.¹, Ďurišová M.¹, Bláha M.², Melenovský V.², Kautzner J.²

¹Institute of Histology and Embryology, The First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and

²Institute for Clinical and Experimental Medicine-IKEM, Department of Cardiology, Prague, Czech Republic

Introduction: The processes underlying the initiation and development of atrial fibrillation (AF) are still not sufficiently explored. This most common arrhythmia is associated with an increase in mortality risk that is strongly related with old age. One of the generally recognized factors contributing to persistency of AF is structural remodeling of the myocardium. There is alteration in both cardiomyocyte morphology as well as changes affecting endomysium.

Aim: In this study we focused on morphological and functional changes in endomysium of atrial myocardium with special focus on immunohistochemical detection of CD45+ cells, representing the whole leukocyte population. In addition, we began to characterize different types of infiltrating leukocytes.

Methods: We analyzed atrial biopsies obtained from patients undergoing bypass or mitral valve surgery. The patients had a regular sinus rhythm or were suffering from AF. The atrial samples were fixed with 4% paraformaldehyde and embedded into paraffin. Sections from atrium were histologically examined using routine hematoxylin-eosin staining. For detection of different types of leukocytes the following markers were detected immunohistochemically: CD45 as a pan-leukocyte

marker, CD3 for T-lymphocytes, CD68 for monocyte/macrophages and mast cell tryptase for mast cells. Three-step immunoperoxidase detection was performed on paraffin sections after antigen retrieval and images were taken using Leica DMLB microscope equipped with DC300 camera. For double labeling we used immunofluorescence approach and images were taken using a confocal laser scanning microscope (FV1000, Olympus)

Results: In all atrial samples from both groups examined in the pilot study we detected CD45+ cells in atrial myocardium as well as in endocardium and epicardium. The frequency of these cells was variable. Cells were either isolated or grouped in small clusters. Apparently, CD45+ cells formed a heterogeneous group of cells. We also detected CD68+ cells, CD3+ cells and mast cells. A dual immunostaining showed CD45+/CD3+ and CD45+/CD68+ double positive cells. There were also CD45+ and CD68+ cells with elongated shape sending out long cellular processes, which may correspond to activated macrophages and/or dendritic cells. We performed a semiquantitative analysis of these cells and found that they are more frequent in auricular samples from patients with atrial fibrillation. The difference reached statistical significance in the right atrial samples.

Conclusion: Our results document that CD45+ cells are a heterogeneous cell population in atrial myocardium from patients undergoing open heart surgery and these cells can be detected regardless of the heart rhythm. The finding of higher frequency of CD45+ leukocytes with elongated processes in the AF samples suggests the activation of inflammatory cells in this arrhythmia.

This work was supported by the Research Program of Charles University – PRVOUK -P25/LF1/2.

13) Elastin in Human Atrial Wall During Atrial Fibrillation

Lantová L.¹, Smrodinova N.¹, Melenovský V.², Bláha M.², Kautzner J.², Kučera T.¹

¹Charles University in Prague, The First Faculty of Medicine, Institute of Histology and Embryology, Prague, Czech Republic

²Institute for Clinical and Experimental Medicine, The Cardiology Centre, Prague, Czech Republic

Atrial fibrillation (AF) is a common arrhythmia associated with an increased risk of cardiac failure and mortality. It is accompanied by structural and electrical changes of the myocardium, with atrial fibrosis being one of the most important ones. This specific structural remodelling mechanism has been widely studied and was shown to create a substrate promoting AF. Apart from collagen involved in atrial fibrosis, there are a number of other extracellular molecules that could play an important role in AF. The aim of this study was to expand the knowledge about these molecules and evaluate the effect of AF on the expression of elastin.

The myocardial elastin expression (elastin volume fraction, EVF) was studied in atrial biopsies sampled from right auricle, left auricle and left atrium of patients with AF and sinus rhythm (SR) during bypass or mitral valve surgery. The samples were fixed with 4% paraformaldehyde and embedded into paraffin. The general morphology was evaluated after a routine hematoxylin-eosin staining of the sections, and elastin was detected by an immunohistological staining. The morphometrical evaluation, performed using image analysis software, compared the fraction of elastin fibers in the measured myocardial area between AF and SR samples.

Routine histological examination of the sections independent of the experimental group revealed no site specificity of the elastin expression. When comparing AF to SR samples, our results showed a non-significant higher expression of elastin in the myocardium of SR patients. This is in contrast to the higher collagen fraction during AF atrial fibrosis compared to SR, as observed in our previous study. Furthermore, EVF was significantly increased in the samples from the right auricle in comparison to the left auricle or both.

We conclude that even though the expression of collagen and elastin in human myocardium during AF is reverse, it is closely related and deserves further investigation. The increased EVF in the right auricle suggests that elastin is closely related or could even contribute to the myocardial mechanics.

Supported by research projects of the Charles University in Prague (UNCE 204013 and PRVOUK P25/LF1/2), grants from the Ministry of Health (MZO-00023001), and by the EU Operational Program Prague – Competitiveness; project „CEVKOON“ (CZ.2.16/3.1.00/22126).

14) Rosiglitazone-mediated stimulation of LA-12-induced apoptosis is accompanied by changes in colon cancer cell cycle progression

Lauková J.^{1,2,3}, Hofmanová J.^{1,2}, Sova P.⁴, Straková N.^{1,5}, Hermann J.⁵, Kolář Z.⁶, Kozubík A.^{1,2}, Hyršlová Vaculová A.^{1,3}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic

²Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Center of Biomolecular and Cellular Engineering, International Clinical Research Center, St. Ann's University Hospital Brno, Czech Republic

⁴Platinum Pharmaceuticals, a.s., Brno, Czech Republic

⁵Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

⁶Institute of Clinical and Molecular Pathology, University Hospital, Olomouc, Czech Republic

Rosiglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), possess anticancer properties and has been shown to reduce growth and metastasis in some tumor types. PPAR gamma can affect the expression of many genes involved in regulation of cytokinetics and may also have a potential to be used as a sensitizer to the killing effects of some chemotherapeutic agents. LA-12 is a new platinum-based drug with increased intracellular penetration and better cytotoxic/cytostatic properties in cancer cells compared to conventionally used platinum chemotherapeutics. In order to further maximize its killing potential in colon cancer cells, LA-12 was combined with rosiglitazone, and molecular mechanisms involved in the increased toxicity of the drug combination were examined.

We showed that pretreatment of human colon cancer cells HCT116 with rosiglitazone resulted in p53-independent enhancement of LA-12-induced caspase-dependent apoptosis. These effects were accompanied with modulation of the cell cycle distribution, especially of S and G2/M phase, as documented by flow cytometry analysis of propidium iodide-stained cells, and also reflected by changes of the level of relevant cell-cycle regulatory proteins. The results of a detailed analysis of apoptosis and cell cycle regulation following the combined action of rosiglitazone and LA-12 in colon cancer cells will be presented in our contribution.

This work was supported by the IGA of the Ministry of Health of the Czech Republic (NT/11201–5) and FNUSA-ICRC European Regional Development Fund No. CZ.1.05/1.1.00/02.0123, HistoPARK – CZ.1.07/2.3.00/20.0185

15) Laser capture microdissection as a tool of molecular biology

Luzna P., Ehrmann J. Jr.

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Laser capture microdissection is a relatively young method used both in biomedical science as in other studies of animal and vegetable tissues and cells. Current human medicine and its methods of investigation are based on both current established processes, and simultaneously there are new experimental approaches from molecular biology tested. In this context it is highly desirable that the studied tissue is homogenous and representative population of cells. For this purposes at the late 80's the method of laser capture microdissection (LCM) has been developed, the first publication dealing with this method was released even at 1996. In current databases of literature we are able to find hundreds of papers focused on LCM such a method or as a part of methodic approach of experiments whose results have to lead to the improved knowledge of genetic and proteomic nature of various diseases. This knowledge is the great promise of successful targeted therapy in the future.

16) Srovnání molekulárně diagnostických metod pro detekci polymorfismů v genu TPMT

Pížová K.¹, Zaoralová R.¹, Kolorz M.², Bartošová L.², Uličná D.¹, Uličný B.¹

¹YBUX s.r.o., Brno

²Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, VFU Brno

Enzym thiopurin-S-methyltransferáza (TPMT) je zodpovědný za metabolismus thiopurinových léčiv. Thiopurinová léčiva jsou nasazována u pacientů, u nichž je cílem potlačit imunitu (transplantace, revmatická artritida, Crohnova choroba, lupus atd.). V genu pro enzym TPMT se přibližně u 10 % europoidní populace vyskytují jednonukleotidové polymorfismy, které snižují funkčnost enzymu. Thiopuriny u těchto pacientů nejsou úplně metabolizovány, což má za následek závažné vedlejší účinky, které mohou vést až k selhání léčby. V současné době není zavedena rutinní genotypizace pacientů užívajících thiopurinová léčiva. Je to dáno i faktem, že na trhu není dostupná dostatečně jednoduchá, rychlá a levná metoda pro analýzu těchto polymorfismů.

Společnost YBUX s.r.o. ve spolupráci s Laboratoří farmakogenetiky VFU Brno vyvinula diagnostickou soupravu na principu polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR). Pomocí tohoto kitu lze identifikovat tři nejfrekventovanější polymorfismy v genu TPMT (238G C, 460G A, 719A G). Součástí produktu jsou i syntetické plasmidové konstrukty, které slouží jako pozitivní kontrola pro wild-type i mutantní alelu.

Cílem této práce bylo srovnat vyšetření mutací v genu TPMT pomocí detekční soupravy vyvinuté společností YBUX se dvěma konkurenčními produkty. První srovnávaná metoda je také založena na real-time PCR, druhá pak využívá princip hybridizace produktů amplifikace na testovací proužky obsahující alelově specifické oligonukleotidové sondy imobilizované do rovnoběžných linií. Při porovnávání byla stanovena tato kritéria: úspěšnost zachytu polymorfismů, úspěšnost PCR, citlivost reakce, uživatelská vstřícnost postupu analýzy, doba trvání analýzy. Srovnání metod bylo provedeno na 40 vzorcích DNA. Vstupní koncentrace DNA se pohybovala od 0,1 µl/ml do 5 µl/ml.

Porovnání výsledků prokázalo, že diagnostická souprava vyvinutá společností YBUX je pro stanovení polymorfismů v genu TPMT z uživatelského pohledu optimální. Kit je schopen zachytit mutace i ve vzorku s nejnižší koncentrací DNA. Faktor lidské chyby je minimalizován, protože příprava reakce obnáší pouze přidání vzorku DNA nebo standardu k hotové reakční směsi. Další srovnávané metody vyžadovaly delší dobu přípravy reakce, výrazně vyšší počet kroků pracovního postupu a vykazovaly nižší citlivost detekce.

Podpořeno grantem MPO č. FR-TI2/075.

17) Fibrosis and microvascular density in human atrial wall during atrial fibrillation

Smorodinova N.¹, Bláha M.², Martínek J.¹, Melenovský V.², Kautzner J.², Kučera T.¹

¹Institute of Histology and Embryology, The First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

²Institute for Clinical and Experimental Medicine-IKEM, Department of Cardiology, Prague, Czech Republic

Introduction: Atrial fibrillation (AF) is one of the most common arrhythmias in the clinical practice and it is associated with an increase in mortality risk that is strongly related with old age. Its pathogenesis is still not sufficiently explored. One of the generally recognized factors contributing to the initiation and maintenance of atrial fibrillation is structural remodeling of the myocardium. Structural remodeling is reflected by changes that affect both atrial cardiomyocytes as well as endomysium.

Aim: In this project we focused on morphological and functional changes in endomysium of atrial myocardium. We focused on changes in the collagen volume fraction and microvascular density.

Methods: We studied the morphological changes of atrial biopsies performed at 46 patients (19 patients with AF, and 27 with sinus rhythm (SR)) undergoing bypass or mitral valve surgery. The atrial samples were fixed with 4% paraformaldehyde and embedded into paraffin. Sections from atrium were histologically examined using routine hematoxylin-eosin staining. For quantification of collagen volume fraction (CVF), the sections were stained with the picrosirius staining. All morphometrical parameters were obtained using interactive image analysis software (LeicaQWin, Leica Microsystems). CVF was quantified as an area fraction of myocardial tissue section containing collagen fibers labeled with picrosirius staining. Only endomysial collagen fibers were quantified, while perimysial connective tissue was omitted. To detect capillaries and to quantify microvascular density we stained the sections using UEA-lectin and used the above mentioned image analysis software.

Results: We found variable amount of endomysial collagen in myocardial samples from both groups of patients. Morphometrical calculation of CVF revealed the following results. The CVF in the left auricle was $23.8 \pm 5.1\%$ in patients with SR and $28.4 \pm 6.7\%$ in patients with AF. The CVF in the left atrium was $24.2 \pm 3.1\%$ in patients with SR and $29.3 \pm 8.8\%$ in patients with AF. The CVF in the right auricle was $27.4 \pm 6.1\%$ in patients with SR and $27.2 \pm 4.5\%$ in patients with AF. In all atrial samples the average CVF was $27.9 \pm 6.2\%$ in patients with AF and $26.0 \pm 5.7\%$ in patients with SR. Morphometrical calculation of absolute number of microvessels (MVD, vessels per mm^2) revealed the following results. The MVD in the left auricle was 436.7 ± 154.7 in patients with SR and 456.8 ± 160.6 in patients with AF. The MVD in the left atrium was 369.4 ± 167.8 in patients with SR and

379.6 ± 124.4 in patients with AF. The MVD in the right auricle was 321.4 ± 96.3 in patients with SR and 289.2 ± 101.5 in patients with AF. In all atrial samples the average MVD was 353.4 ± 125.3 in patients with AF and 388.7 ± 147.3 in patients with SR.

Conclusion: Our preliminary results document the variable level of fibrosis in atrial myocardium from patients undergoing open heart surgery. In the left atrial samples from patients with AF we observed an increased CVF and MVD.

This work was supported by grants from Ministry of Health (MZO-00023001), by the EU Operational Program Prague – Competitiveness; project „CEVKOON“ (CZ.2.16/3.1.00/22126) and by PRVOUK – P25/LF1/2.

18) Využití metody StripAssay k prediktivní detekci mutace B-raf v kodónech 600/601 u maligního melanomu

Staněk L., Dundr P., Jakša R., Lísová S., Ludvíková M.
Ústav patologie I. LF UK a VFN v Praze

Maligní melanom je zhoubný novotvar s celosvětově výrazně vzrůstající incidencí, který je odvozen od pigmentových buněk derivovaných z neurální lišty.

V rámci prediktivní patologie a s rozvojem personalizované medicíny se otevírají i nové možnosti terapie. U maligního melanomu lze sledovat několik biomarkerů. Jako jeden z nejvýznamnějších se jeví gen BRAF. Gen BRAF je lokalizován v chromozomálním regionu 7q34, skládá se z 18 exonů a délka transkribované mRNA je 2478 bp. Aktivující mutace tohoto protoonkogenu se objevují u mnoha maligních nádorů, včetně melanomu, u kterého se vyskytují asi ve 40 % případů. U benigních melanocytárních lézí se tato mutace vyskytuje zcela běžně. Ke většině mutací dochází na kodonu 600/601, z toho v 60 % se jedná o mutaci V600E. Ovšem i minoritní mutace, jako jsou mutace V600G, K, R, D, M a K601E (mutace V600A se u melanomů neobjevuje), mají prediktivní význam. Do naší prezentované pilotní studie bylo zařazeno 10 pacientů s histologicky ověřenou diagnózou maligního melanomu. Z této testované skupiny bylo 9 vzorků validních (90 %) a jeden nevalidní (10 %). Pomocí kitu StripAssay Braf 600/601 (ViennaLab; Pentagene) jsme detekovali jednak nejčastější mutaci V600E, ale i 7 dalších mutací (V600A, G, K, R, D, M a K601E). Byla použita robotická hybridizace pomocí Robotics Bee20 a vyhodnocení bylo provedeno prostřednictvím StripAssay Evaluatoru Verze 2.6.

Z 9 validních vzorků byla ve 3 případech detekována mutace, dvakrát V600E a jednou V600K. U ostatních případů byl detekován WT.

Přesná frekvence výskytu minoritních mutací genu BRAF u maligního melanomu není doposud známá, jejich výskyt má však prediktivní význam a pro nasazení biologické léčby (Cetuximab, Panitumumab, Vemurafenib) je tedy nutné je testovat.

19) Dubin Johnsonův syndrom: koincidence s kolorektálním karcinomem a pokročilou aterosklerózou u 82letého pacienta

Sticová E.^{1,2,4}, Elleder M.³, Hůlková H.³, Novotný J.¹, Lukšan O.¹, Jirsa M.¹

¹Laboratoř experimentální hepatologie CEM IKEM Praha

²Ústav patologie 3. LF UK Praha

³Ústav dědičných a metabolických poruch 1. LF UK a VFN Praha

⁴Masarykova nemocnice o.z. Ústí nad Labem

Záchyt vzácné hyperbilirubinémie Dubin Johnsonova typu, způsobené dvěma dosud nepopsanými patogenními mutacemi, u 82letého pacienta s orgánovými komplikacemi aterosklerózy a kolorektálním karcinomem a význam imunohistochemie a molekulárně genetických metod při stanovení diagnózy.

Úvod: Chronická hyperbilirubinémie snižující oxidativní stres je považována za jeden z protektivních faktorů v procesu kancerogeneze a aterogeneze. Dubin-Johnsonův syndrom (DJS) je autozomálně recesivní onemocnění podmíněné deficitem ABCC2, provázené kolísavou, převážně konjugovanou hyperbilirubinémií, diagnostikované obvykle v období dospívání či v mladším dospělém věku. V diagnostice DJS se kromě biochemického vyšetření hladiny konjugovaného a nekonjugovaného bilirubinu a aktivity jaterních enzymů uplatňuje stanovení izomerů korpoporfyrinů I a III, choleoscintigrafie a molekulárně genetické vyšetření. Jaterní biopsie do základního vyšetřovacího panelu DJS nepatří, avšak histologické a imunohistochemické vyšetření může významně pomoci v komplikovanějších případech. V následujícím sdělení prezentujeme neobvyklý případ prvozáchyty DJS u 82letého pacienta s kolorektálním karcinomem a pokročilou aterosklerózou.

Pacienti a metody: 82letý pacient byl přijat k dovyšetření patologických jaterních testů (celkový bilirubin 79–220 $\mu\text{mol/l}$, přímý bilirubin 43–171 $\mu\text{mol/l}$, GGT 1,95–4,7 $\mu\text{kat/l}$ a ALP 1,3–3,64 $\mu\text{kat/l}$). Pro podezření na hepatotoxické poškození byla provedena jaterní punkce, která prokázala masivní akumulaci melanin-like pigmentu v hepatocytech. Pro imunohistochemické vyšetření exprese proteinu MRP2 byla použita primární protilátka anti-MRP2, klon M2III-6, Kamiya, Seattle, WA. Analýza genu ABCC2/MRP2 byla provedena přímým sekvenováním DNA izolované z leukocytů periferní krve. K průkazu heterozygotní delece v exonu 18 byla použita metoda sekvenace separovaných alel po zaklonování vyšetřovaného úseku genu ABCC2 do vektoru pCR4.1-TOPO (Invitrogen). Heterozygotní bodová záměna v intronu 23 byla potvrzena metodou PCR-Bsh1236I RFLP.

Výsledky: Histologické a elektronmikroskopické vyšetření jaterní tkáně prokázalo masivní akumulaci hnědého granulárního pigmentu v lysozomech hepatocytů s tinkčními vlastnostmi melanin-like pigmentu typického pro DJS. Imunohistochemicky byla prokázána absence proteinu MRP2 v kanálíkové membráně hepatocytů. Molekulárně genetickým vyšetřením DNA získané z leukocytů periferní krve byly identifikovány dvě nové

patogenní mutace, a to heterozygotní delece c.2360_2366del-CCCTGTC v exonu 18 a heterozygotní bodová záměna c.3258+1G>A v intronu 23, mající za následek abnormální sestřih ABCC2 mRNA. Diagnóza kolorektálního karcinomu s generalizací do spádových lymfatických uzlin byla verifikována v resekátu histologicky. Morfologickým podkladem klinicky manifestní ICHS byla ateroskleróza 3. stupně s významnými stenózami větvičných tepen, verifikovaná při autoptickém vyšetření.

Závěr: V kazuistickém sdělení prezentujeme neobvyklý případ prvozáchyty DJS u 82letého pacienta, způsobeného dvěma dosud nepopsanými patogenními mutacemi. Naše pozorování a případy popsány v literatuře rovněž ukazují, že chronická hyperbilirubinémie u DJS neznamenaá spolehlivou protekci před procesem aterogeneze a kancerogeneze.

20) Oxaliplatin with PPAR γ ligand modulate regulation of the cell cycle and cell death of colon tumors

Straková N.^{1,2,3}, Hofmanová J.^{1,2}, Souček K.^{1,4}, Fedr R.¹, Hyršlová Vaculová A.^{1,2}, Zapletal O.¹, Tylichová Z.^{1,2}, Lauková J.^{1,2}, Bouchal J.^{2,3}, Hermann J.^{2,3}, Kolář Z.^{2,3}, Kozubík A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Brno, Czech Republic

²Biomedical Centre of Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

³Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Czech Republic

⁴Center of Biomolecular and Cellular Engineering, International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

Platinum chemotherapeutics are commonly used in the treatment of many solid tumors, as for example testicular, bladder, ovarian, colorectal, lung, head and neck cancers etc. Oxaliplatin (L-OHP) in combination with fluoropyrimidines, leucovorin or irinotecan (scheme FOLFOX, FOLFIRI etc.) is widely used in chemotherapy treatment of colon tumors. Dose-limiting toxicities and resistance are significant problem in successful treatment of patients. Usually, more than one resistance mechanism is activated. Therefore, new combined chemotherapies are considered. We focused on effect of combination of L-OHP with PPAR γ ligand (rosiglitazone; RGZ) in human colon cancer cell lines.

PPAR α , β/δ , γ (Peroxisome Proliferator – Activated Receptors) belong to large family of nuclear receptors. They could influent regulation of glucose and lipid metabolism, energy balance, adipocyte differentiation, atherosclerosis, diabetes, inflammation and cancer. However, the effect of PPAR γ in colorectal tumors remains still controversial. PPAR γ has been

described in both normal and many different cancer cell types. In colorectal tumor patients with higher PPAR γ expression the improved survival was observed.

Our results have shown that RGZ increased activity of PPAR γ receptor and decreased proliferation of colon cancer cells in dose – dependent manner. Western blot analysis and immunostaining have shown that RGZ decreased nuclear localization and expression of PPAR γ . Interestingly, after 24 hours RGZ slightly increased BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) incorporation into the nucleus.

Combination of RGZ with L-OHP decreased cell proliferation, arrested the cell cycle in G2/M, increased apoptosis, and increased cell cycle related and DNA damage protein expression. We suggest that increased percentage of active BrdU cells by RGZ may supports the effects of L-OHP.

This work was supported by grant of Internal Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic No. NT/11201–5, grant Czech Science Foundation No. P301/11/1730 and FNUSA-ICRC European Regional Development Fund no. CZ.1.05/1.1.00/02.0123.

21) Přehled gastrointestinálních stromálních tumorů diagnostikovaných na Ústavu patologie FN Ostrava v letech 2010 až 2012

Tomanová R.¹, Dvořáčková J.¹, Mačák J.², Buzrla P.¹, Ehrmann J.^{3,5}, Brychtová S.^{3,5}, Krhutová V.⁴, Tavandzis S.⁴, Janíková M.⁵

¹Ústav patologie FN Ostrava

²LF OU Ostrava

³Ústav patologie FN Olomouc

⁴PaR LAB a.s. Nový Jičín

⁵LMP LF UP Olomouc

V našem souboru prezentujeme 9 případů gastrointestinálních stromálních tumorů (GISTů), u nichž sledujeme histologický vzhled, imunohistochemické vyšetření, velikost, lokalizaci, riziko agresivního chování a u některých případů rovněž molekulárně genetické vyšetření mutací genů KIT nebo PDGFRA, dále věk a pohlaví pacientů.

GISTy představují nejčastější mezenchymální nádory gastrointestinálního traktu a pro naprostou většinu z nich je charakteristická exprese transmembránového proteinu KIT (povrchová molekula CD117). Jejich vznik je spojován s aktivačními mutacemi tyrozinkinázy KIT (studie Hirohity z roku 1998) nebo tyrozinkinázy PDGFRA (studie Heinricha z roku 2003). Podle současných informací se současný výskyt primárních mutací v obou genech vylučuje. Přesná lokalizace mutací v těchto genech určí citlivost, resp. rezistenci na biologickou terapii. V biologické terapii metastatických, recidivujících nebo inoperabilních nádorů se využívají inhibitory tyrozinkináz, a to imatinib mesylát

a sunitinib malát. U některých nádorů se přítomnost mutací nezjistí ani v jednom z vyšetřovaných genů a mechanismus vzniku těchto nádorů se vysvětluje mutacemi v genech pro jiné receptorové tyrozinkinázy.

V prezentovaném souboru je 5 žen a 4 muži (tři běloši a jeden černoch), s průměrným věkem 42,5 roku. Ve třech případech byl nádor lokalizován v žaludku, ve čtyřech případech v tenkém střevě, v jednom případě v jícnu a v jednom případě v mezenteriu. Nejmenší GIST měl průměr 1 cm, největší 65 cm, průměrná velikost nádoru činila 14 cm. Imunohistochemické vyšetření k průkazu CD117 bylo pozitivní ve všech nádorech (v jednom případě pouze fokálně). Ve čtyřech případech šlo o smíšený GIST, ve třech případech o vřetenitý GIST, ve dvou případech o epitheloidní GIST. Zvýšené riziko agresivního chování bylo diagnostikováno u třech GISTů, střední riziko u dvou GISTů a nízké riziko u třech GISTů. Molekulárně genetické vyšetření bylo provedeno ve čtyřech případech, přičemž u jednoho nádoru byla detekována mutace v exonu 18 genu PDGFRA a u třech šlo o mutaci exonu 11 genu KIT.

22) Fosforylační stav E3-ubikvitin ligázy CHIP může ovlivňovat její vazbu k chaperonům HSP70/90

Trčka F., Ďurech M., Miller P., Vojtěšek B.

Regionální Centrum Aplikované Molekulární Onkologie (RECAMO), Masarykův onkologický ústav, Brno

Proces skládání proteinů do jejich nativní konformace je často zajišťován aktivitou molekulárních chaperonů HSP70/90. Proteiny, jejichž skládání není chaperony HSP70/90 úspěšně ukončeno, jsou degradovány ubikvitin-proteasomovým systémem. Za tímto účelem eukaryotní buňky disponují řadou tzv. E3-ubikvitin ligáz, jejichž prostřednictvím dochází k přenosu molekuly ubikvitinu na proteiny určené k degradaci. E3-ubikvitin ligáza CHIP je molekulární interakcí přímo asociovaná s chaperony HSP70/90 a bezprostředně se tak podílí na degradaci jejich klientních proteinů. Mezi klientní proteiny systému HSP70/90, jejichž hladina je ovlivněna ligázou CHIP, patří jak nádorové supresory, tak onkoproteiny. Aktivita ligázy CHIP tedy může ovlivňovat proces nádorové transformace buňky pozitivně i negativně. Významným regulačním mechanismem aktivity ligázy CHIP je její schopnost vazby na proteiny HSP70/90. Ačkoli je interakční rozhraní mezi proteiny CHIP a HSP70/90 dobře popsáno, vliv posttranslačních modifikací na tuto interakci je znám pouze neúplně. Znalost posttranslačních mechanismů ovlivnění vazby ligázy CHIP na chaperony HSP70/90 může otevřít nové cesty k cílené regulaci její aktivity.

V této práci se zaměřujeme na roli fosforylace v N-terminální oblasti ligázy CHIP. S použitím fosfomimetických a fosfoablativních mutantů ligázy CHIP ukazujeme, že fosforylace v této

oblasti molekuly CHIP může mít vliv na její vazbu na chaperony HSP70/90.

Tato práce byla podporována grantem Grantové agentury České republiky GAČR P301/11/1678 a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

23) Dietary lipids modulatory effects on colon cancer cells

Tylichová Z.^{1,2}, Hofmanová J.^{1,2}, Straková N.¹, Hyršlová Vaculová A.¹, Kozubík A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Brno, Czech Republic

²Department of Animal Physiology and Immunology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dietary lipids, especially specific fatty acids are important modulators of various physiological functions and significantly contribute to maintenance of intestinal epithelium homeostasis. Disturbance of this homeostasis substantially contribute to colon cancer development. We investigated and compared the response of human epithelial cell lines derived from fetal colon (FHC) and colon adenocarcinoma (HT-29) to i) docosahexaenoic acid (DHA), an essential ω -3 polyunsaturated fatty acid, ii) sodium butyrate (NaBt), short chain fatty acid produced by microbial fermentation of fibre in the colon, and iii) their combination. We supposed mutual interaction of the signaling pathways triggered by these two fatty acids, which may significantly modulate the cell survival/death.

Using fluorimetry, flow cytometry and western blotting methods we investigated various changes in cytokinetic and lipid metabolism parameters. Our results showed that NaBt alone or in combination with DHA can decrease proliferation (CyQUANT, cell cycle analysis), induce differentiation (alkaline phosphatase activity), apoptosis (caspase-3 and PARP cleavage) and also autophagy (LC3 cleavage) depending on cell line and time of treatment. These effects were associated with alteration in lipid droplet accumulation, reactive oxygen species production, mitochondrial membrane potential and with modulation of the expression or activity of some regulatory molecules connected with lipid metabolism such as fatty acid synthase, caveolin-1 and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ . These results point out the important role of dietary lipids in colon epithelial cell behaviour.

Supported by grants Nos. P301/11/1730 and 13–09766S of Czech Science Foundation.

24) An association of molecular genetic parameters in gliomas and meningiomas with histological type and grade

Urbanovská I.^{1,2,3}, Konvalinka D.¹, Uvírová M.^{1,2,3}, Tomanová R.^{2,4}, Buzrla P.⁴, Marková D.¹, Paleček T.⁵, Dvořáčková J.^{2,4}, Drábek J.³

¹CGB laboratory Inc., Laboratory of molecular genetics and pathology, Ostrava, Czech Republic

²Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

³Faculty of Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

⁴University Hospital in Ostrava, Institute of Pathology

⁵University Hospital in Ostrava, Neurosurgery Clinic

Introduction: Primary brain tumors account for about 2% of all adult malignancies. The incidence of primary brain tumors has nearby doubled within the past 30 years and was 7.95 per 100 000 inhabitants in the Czech Republic (in 2010). The most common brain tumors are gliomas and meningiomas. Gold standard for the classification of primary brain tumors is WHO classification; however, this classification is based on subjective criteria. Thus the individual prognosis and prediction of response to treatment remains still inadequate. Within the past 20 years, the number of biomarkers (chromosomal, genetic and epigenetic alterations, associated with a specific histological type and grading) has been identified in gliomas. Typical chromosomal aberrations associated with histological subtypes and grading were revealed in meningiomas too.

Material and Methods: To detect the most frequent chromosomal aberrations in fresh frozen or FFPE tumor samples, the method of interphase fluorescence in situ hybridization (i-FISH), including directly labelled, locus-specific and/or centromeric probes made by Abbott (Vysis), or Kreatech (Poseidon) were used. Histological type and grade of brain tumor samples were determined according to WHO criteria of tumor classification by analysing hematoxylin-eosin stained slides and immunohistochemically stained slides of processed tumor tissues.

Results: Since 11/2007 till 12/2012, 436 brain tumor samples were collected. 312 (72%) cases were diagnosed with primary brain tumor and these samples were analysed by i-FISH. 111 (25%) cases of the tumors were metastatic tumors of various organ origin (not analysed). i-FISH was unsuccessful in 13 cases (3% of samples).

Gliomas accounted for 63% of cases, meningiomas accounted for 30% of analysed samples. Neurinomas, medulloblastomas, papi llomas and primitive neuroectodermal tumors accounted for remaining 7% of collected brain tumor samples. Genetic aberrations associated with high grade gliomas were found in 38% of patologically diagnosed cases of low grade gliomas (gr. I and II).

Aberrations associated with diagnose of atypical or anaplastic meningioma were found in 47% of cases of pathologically diagnosed meningiomas gr. I. The relapse occurred in 8.5% of cases with benign meningiomas gr. I.

Conclusions: Chromosomal aberrations found in patients with primary brain tumors by i-FISH contributed to accuracy improvement of the histopathological diagnosis. Aberrations with aggressive biological potential can indicate a higher risk of progression or recurrence of the tumor. In these cases careful monitoring by imaging methods was performed, especially when radical extirpation of the tumor was impossible.

25) Sledování mikrovaskulární denzity u kožních melanomů a melanocytárních névů

Židlík V.¹, Brychtová S.³, Dvořáčková J.^{1,2}, Uvírová M.¹, Šustíková J.¹

¹CGB laboratoř a.s.

²FNO Ostrava

³Ústav patologie a laboratoř molekulární patologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc

Angiogeneze je důležitým faktorem, který ovlivňuje progresi nádorového onemocnění. Je známo, že pouze v iničiální fázi nádoru je jeho růst zajištěn difuzí kyslíku a živin z okolních tkání. Tento stav je však limitován velikostí, tumor bez vlastní kapilární sítě může dosáhnout nanejvýš několik milimetrů v průměru. Výsledky řady studií dále dokumentují i přímou souvislost mezi zvýšením hustoty kapilární sítě v nádoru a horší prognózou. Výsledky se však u jednotlivých typů nádorových onemocnění liší. Cílem naší práce bylo hodnocení mikrovaskulární denzity (MVD) u kožních maligních melanomů různého stádia ve srovnání s kontrolní skupinou pigmentových névů. Pro detekci kapilár byl vybrán nestin, protein, který bývá označován jako marker angiogeneze. Jeho zvýšená exprese byla zaznamenána zejména v proliferaujících endoteliálních buňkách.

Materiál a metody: Vyšetřili jsme soubor 60 kožních maligních melanomů a 25 benigních pigmentových névů. Melanomy byly rozděleny dle WHO klasifikace podle hloubky invaze koria do čtyř skupin – pT1 (n=34 melanomů), pT2 (n=10 melanomů), pT3 (n=12 melanomů) a pT4 (n=4 melanomy). Pro detekci byly použity tkáně fixované ve formalínu a zalité do parafínu. Po odparafinování preparátů v xlenové lázni, zavodnění a blokování endogenní peroxidázové aktivity byly tkáňové řezy o šířce 5 µm zpracovány metodou nepřímé imunohistochemie v barvicím automatu VENTANA, s inkubací s primární monoklonální myší protilátkou anti-nestin (Millipore, clone 10C2, Cat. # MAB5326, ředění 1:75) po dobu 20 min. Vizualizace byla provedena s AEC (aminoethylcarbazolem) jako chromogenem. Mikrovaskulární denzitu jsme hodnotili pomocí světelného mikroskopu počítáním cévních průsvitů na 1 mm² v tzv. „hot spot“, tj. v místě největší hustoty kapilár. Hodnotili

jsme MVD jednak přímo v nádoru, dále na jeho okraji, v místě nehlubší invaze.

Výsledky: Prokázali jsme významné rozdíly v hustotě MVD u jednotlivých skupin melanocytárních lézí. Ve skupině melanomů pT1 byl medián MVD v ložisku melanomu 10, mimo ložisko 17,5. Skupina pT2 měla medián hustoty v ložisku 9,5 a mimo ložisko 17,5. Medián pro skupinu pT3 byl v ložisku melanomu 11 a mimo ložisko 23. Pro skupinu pT4 byl medián v ložisku melanomu 11 a mimo ložisko 25,5. Skupina benigních névů měla medián mikrovaskulární denzity v ložisku névu i mimo ložisko 4.

Závěr: Získaná data ukazují významné zvyšování hodnot MVD v souvislosti se stupněm pokročilosti nádorového onemocnění, přičemž nejvyšší MVD byla zjištěna u nádorů pT4. Zajímavým zjištěním je, že nejvyšších hodnot dosahuje MVD zejména na periferii nádorů. Předpokládáme, že MVD právě v těchto místech podporuje invazivní a agresivní růst nádorových buněk. Hodnocení mikrovaskulární denzity tak může být významným negativním prognostickým faktorem maligních melanomů.

26) The relationship of selected miRNAs to P-glycoprotein, MRP1 and LRP/MVP mediated drug resistance in non-small cell lung cancer

Zizkova V.^{*1}, Janikova M.^{1,2}, Luzna P.², Skarda J.^{1,3}, Radova L.³, Kolek V.⁴, Kolar Z.^{1,3}

¹Department of Clinical and Molecular Pathology and Laboratory of Molecular Pathology,

²Department of Histology and Embryology,

³Institute of Molecular and Translational Medicine,

⁴Department of Tuberculosis and Respiratory Diseases, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic

Lung cancer is classified as one of the most serious causes of cancer mortality worldwide. miRNAs are small non-coding, endogenous, single-strand RNAs that regulating protein levels in cells by cleavage of mRNA target or translational repression. Protein transporters P-gp, MRP1 and LRP/MVP are connected to the emergence of multidrug resistance (MDR) in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. The aim of this study was to determine whether levels of miR-21, miR-126 and miR-205 are associated with the expression of above mentioned proteins. We analysed miR-21, miR-126 and miR-205 in various histological subtypes of NSCLC and correlated their expression with clinico-pathological characteristics progression free survival (PFS) and overall survival (OS) and with expression of P-gp, MRP1 and LRP/MVP. We found no significant relationships between expression of miR-21 and miR-126 and clinico-pathological parameters. However, miR-205 level was significantly increased in squamous cell lung

cancer ($p < 10^{-6}$) compared to other histological subtypes of NSCLC. Additionally, the level of miR-205 inversely correlated with P-gp expression in NSCLC patients ($p = 0.03$). Our results suggest that miR-205 could be used as a diagnostic marker and its downregulation may indicate the emergence of P-gp mediated drug resistance in NSCLC patients.

This work was supported by grants IGA MZCR NT13569, and CZ.1.05/2.1.00/01.0030

27) Endocardial fibroelastosis in chick model of hypoplastic left heart syndrome

Kvasilova A.¹, Pesevski Z.^{1,2}, Stopkova T.¹, Sedmera D.^{1,2}

¹Institute of Anatomy, Charles University, Prague, Czech Republic

²Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

Endocardial fibroelastosis (EFE) is a diffuse thickening of the ventricular endocardium, causing myocardial dysfunction and presenting as unexplained heart failure in infants and children. It is supposed to be due to persistent and increased wall tension in the ventricles. Its frequent association with hypoplastic left heart syndrome (HLHS) lead us to hypothesize that abnormal hemodynamic loading is an important factor in its pathogenesis. We have tested this theory in a chick model of HLHS induced by left atrial ligation (LAL). At ED8 and ED12 modifications of myocardial architecture and fibrosis were studied by histology and immunoconfocal microscopy, and the amount of collagen was quantified by image analysis.

Histology with H&E/Alcian Blue staining did not reveal any significant fibrosis in the LAL hearts with the exception of cardiac skeleton and valves. Immunohistochemistry with collagen I antibody clearly showed a thickening of the layer of subendocardial fibrous tissue. Quantification of staining

area normalized by endocardial circumference showed a significant increase at ED12, but not ED8 in the LAL group. We conclude that abnormal hemodynamic loading stimulates fibrous production in the subendocardium of the hypoplastic left ventricle. Therefore, EFE in HLHS clearly appears to be a secondary effect of abnormal hemodynamics.

Supported by Ministry of Education, PRVOUK-P35/LF1/5, Academy of Sciences RVO: 67985823, and Grant Agency of the Czech Republic P302/11/1308 and 13-12412S.

28) Expres fibroblastového růstového faktoru 2 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

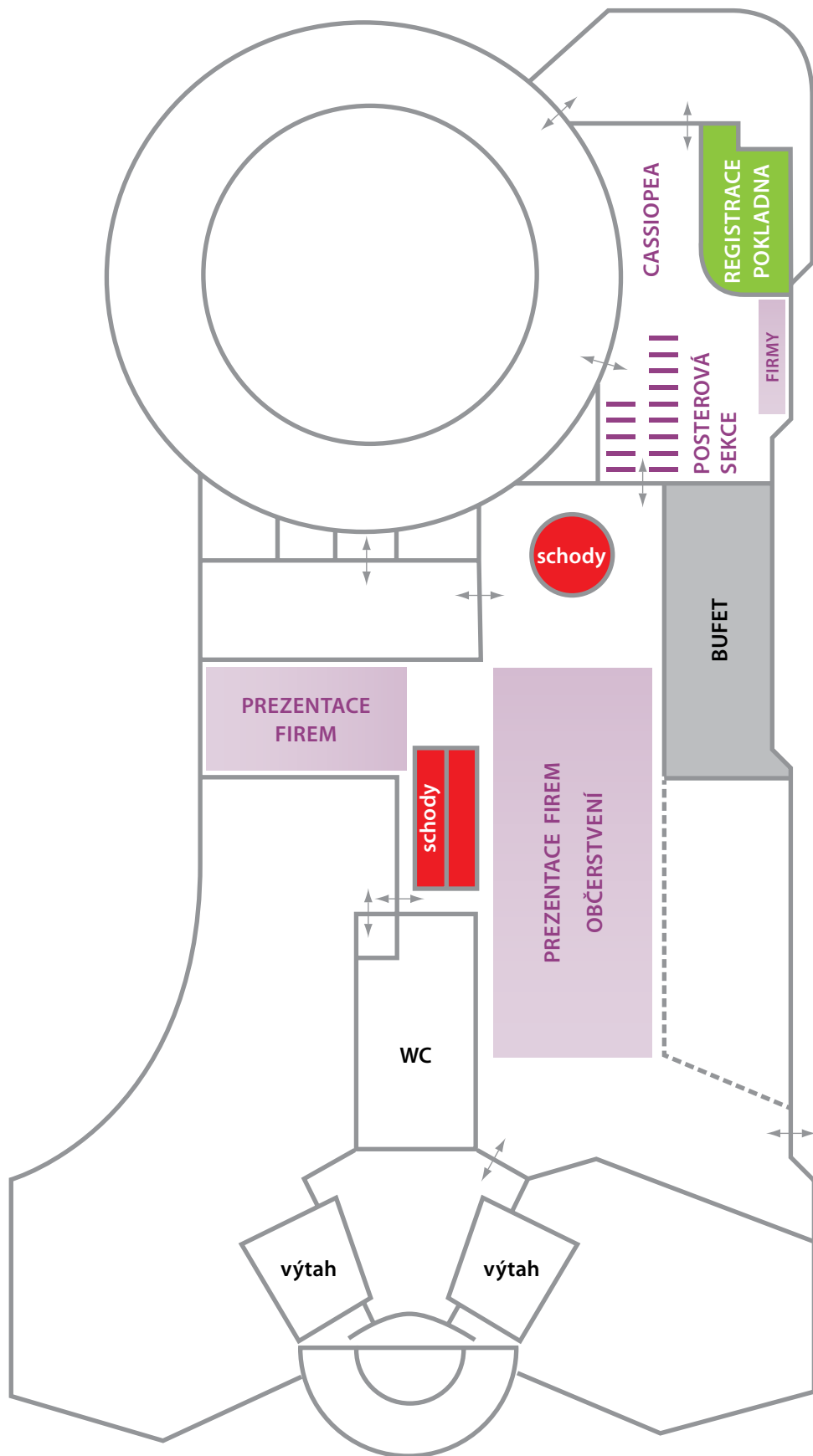
Nekvindová J.¹, Vrbacký F.², Jirchová Z.¹, Řezáčová V.³, Šimkovi M.², Painuly U.², Malý J.², Palička V.¹, Smolej L.²

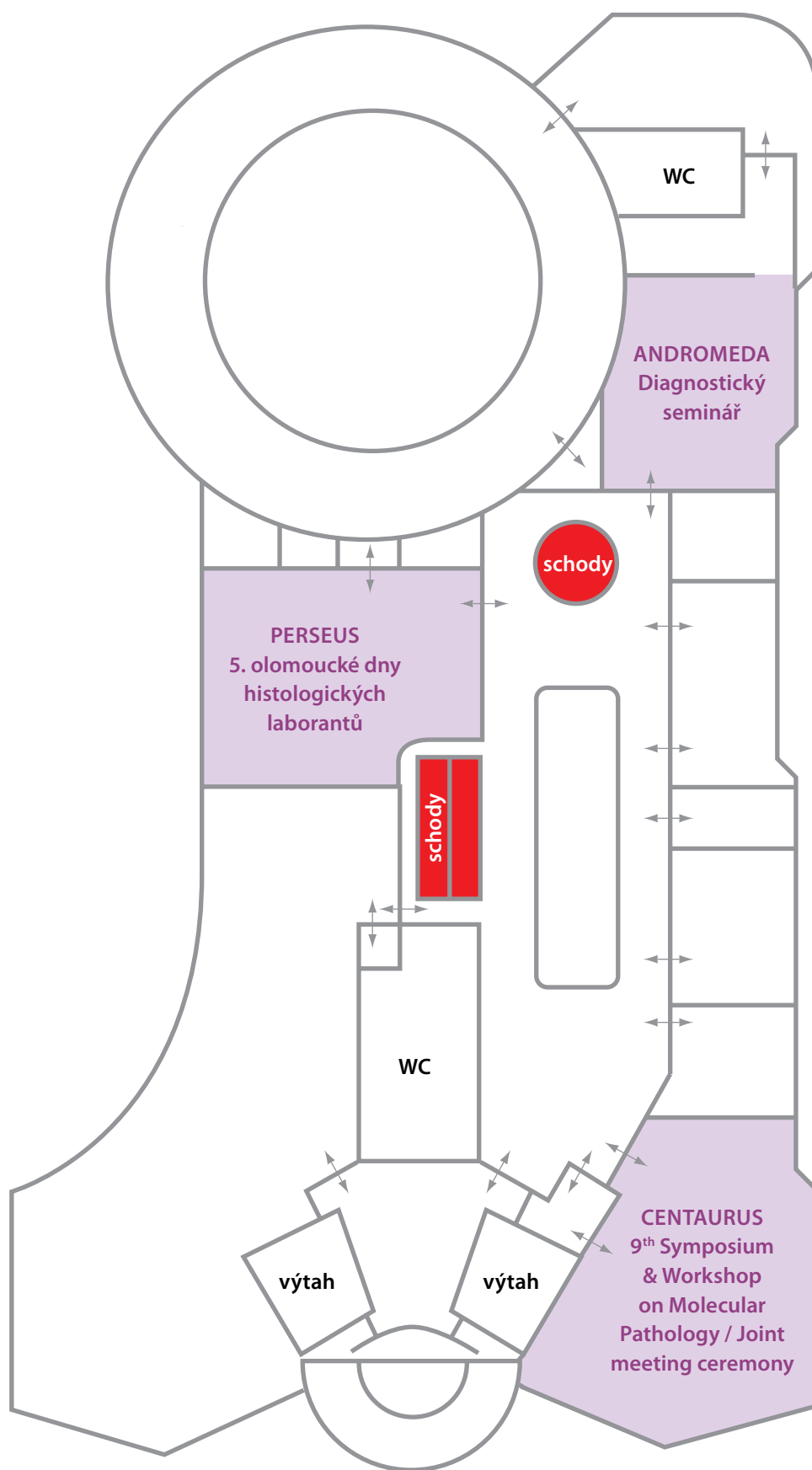
¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové

²IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

³Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

Fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2) je významný cytokin, účastní se regulace buněčné proliferace, diferenciaci, migrace a přežívání. Působí jako angiogenetický faktor a jeho účinek je silnější než např. účinek cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) či destičkového růstového faktoru (PDGF). Zvýšené hladiny FGF-2 jsou v posledních letech popisovány i u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Data popisující expresi FGF-2 samotnými leukemickými buňkami však chybí, stejně jako analýzy vztahu exprese FGF-2 k prognostickým markerům či klinickému průběhu onemocnění. V této studii jsme stanovili expresi genu pro FGF-2 a jeho antisense genu NUDT6 v separovaných CD19+ buňkách u 70 neléčených pacientů s CLL a vyhodnotili ji v kontextu klinických dat a prognostických markerů onemocnění.





HLAVNÍ PARTNEŘI



PARTNEŘI



We make it visible.





Ni-E

Advanced research microscope

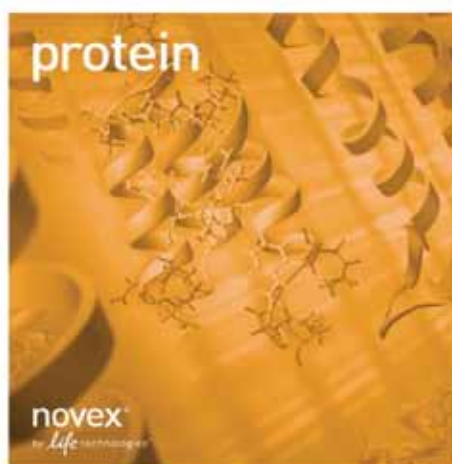
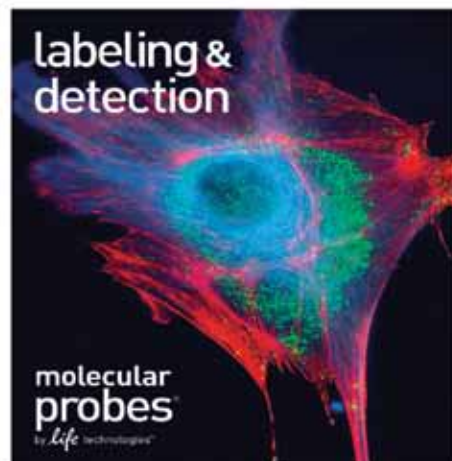
Expandability



- Upright microscope based on world-renowned Eclipse Ti concept
- Full motorisation of stage, condenser, focus, magnification and illumination
- Multi-mode offers extendable infinity space for upgrade to confocal and multi-photon
- Total programmable control via NIS-Elements
- Choice of three "stackable" turrets for fluorescence-manual, intelligent and motorised
- Fixed platform option for in-vivo imaging
- World-class CFI60 nano crystal coat, lambda and 25x water immersion objectives

See the evolution

www.nikoninstruments.com



Life Technologies Czech Republic s.r.o.
V Celnici 1031/4, 110 00 Praha 1

czorders@lifetech.com

+420 235 302 459

life
technologies™

For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.



Invitrogen™

Applied Biosystems®

Gibco®

Molecular Probes®

Novex®

TaqMan®

Ambion®

Ion Torrent™