

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Violeta Bakardjieva-Mihaylova

Role genu *WT1* a dalších molekulárně-biologických abnormalit
u germinálních nádorů varlat

*The role of WT1 gene and other molecular biological abnormalities in testicular
germ cell tumors*



Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
MUDr. Ludmila Boublíková, Ph.D.

Konzultant:
RNDr. Karolina Škvárová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 03. 04. 2020

Mgr. Violeta Bakardjieva-Mihaylova

Identifikační záznam:

BAKARDJIEVA-MIHAYLOVA, Violeta. Role genu *WT1* a dalších molekulárně-biologických abnormalit u germinálních nádorů varlat. [*The role of WT1 gene and other molecular biological abnormalities in testicular germ cell tumors*]. Praha, 2020, 99 stran, 3 přílohy (36 stran). Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie, Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Ludmila Boublíková, Ph.D., Konzultant: RNDr. Karolina Škvárová, Ph.D.

Klíčová slova: gen Wilmsova tumoru 1 (*WT1*), testikulární germinální nádory, rezistence na cisplatinu, sekvenování nové generace, *TP53*, *KIT*

Keywords: Wilms' tumor gene 1 (*WT1*), testicular germ cell tumors, cisplatin resistance, next generation sequencing, *TP53*, *KIT*

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce MUDr. Ludmile Boublíkové, Ph.D. za odborné vedení, za lidský přístup a velkou trpělivost, kterou se mnou měla. Dále svému konzultantovi RNDr. Karolině Škvárové Kramaržové, Ph.D. za podporu, odborné rady a za to jak mě vždy dokázala motivovat, dále prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. za možnost účasti na výzkumu v inspirativním prostředí laboratoří CLIP při Klinice dětské hematologie a onkologie (UK 2. LF a FN Motol). Díky patří i mým kolegům za veselé a přátelské pracovní prostředí. Zvláštní pozornost bych chtěla věnovat všem z kolektivu místnosti 444 za psychickou podporu v nelehkých chvílích mého postgraduálního studia, Mgr. Martině Slámové, Mgr. Kateřině Rejlové, Ph.D. a Mgr. Lence Hovorkové za veškerou pomoc, podporu a praktické rady na poli experimentálního i osobního života. Ráda bych poděkovala i MUDr. Michaelovi Svatoňovi, Mgr. Janu Stuchlému, Ph.D. a RNDr. Karlu Fišerovi, Ph.D. za bioinformatickou pomoc, dále MUDr. Evě Froňkové, Ph.D. a MUDr. Markétě Kubričanové Žaliové, Ph.D. za rady při zpracovávání sekvenčních dat.

Chtěla bych zde vyjádřit svůj vděk svým rodičům, svému manželovi a rodičům mého manžela za opravdu nepřekonatelnou pomoc, bez které by tato práce nevznikla. V neposlední řadě děkuji svým dětem a své sestře za psychickou motivaci.

Obsah

1.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
1.1.	Testikulární germinální nádory	11
1.2.	Vznik a vývoj TGN	14
1.3.	Gen <i>WT1</i> a jeho role při vzniku TGN	18
1.4.	Léčba TGN	22
2.	CÍLE A HYPOTÉZY	24
3.	MATERIÁL A METODY.....	25
3.1.	Pacientské vzorky.....	25
3.2.	Testikulární germinální buněčné linie.....	28
3.3.	Pěstování testikulárních buněčných linií s cisplatinou.....	28
3.4.	Stanovení růstu buněk v kultuře.....	29
3.5.	Stanovení citlivosti na cisplatinu	29
3.6.	Analýza buněčného cyklu pomocí barvení nukleotidovým analogem EdU	29
3.7.	Analýza buněčného cyklu pomocí barvení Hoechst 33342 a Pyronin Y.....	29
3.8.	Analýza apoptózy	30
3.9.	Izolace nukleových kyselin	30
3.10.	Reverzní transkripce.....	30
3.11.	Kvantitativní PCR	30
3.12.	Detekce exprese izoforem genu <i>WT1</i>	32
3.13.	Detekce mutací v genu <i>WT1</i>	33
3.14.	Detekce mutace v genu <i>BRAF</i>	33
3.15.	Amplikonové masivně-paralelní sekvenování	34
3.16.	Celoexomové masivně-paralelní sekvenování	34
3.17.	Transkriptomové masivně-paralelní sekvenování.....	35
3.18.	Imunohistochemické barvení proteinů WT1 a p53	35
3.19.	Analýza a statistické zpracování dat	35
4.	VÝSLEDKY	38
4.1.	Příprava testikulárních germinálních buněčných linií rezistentních na cisplatinu a analýza jejich vlastností	38
4.1.1.	Rezistence testikulárních germinálních buněčných linií na cisplatinu	38
4.1.2.	Analýza buněčného cyklu, proliferace a apoptózy u CDDP-naivních a CDDP-exponovaných buněčných linií	40
4.1.3.	Analýza buněčných linií celoexomovým sekvenováním.....	43

4.1.4.	Analýza buněčných linií na úrovni transkriptomu	44
4.1.5.	Analýza změn v počtech genových kopií (CNV) u testikulárních germinálních buněčných linií	46
4.1.6.	Stanovení mutační zátěže (TMB).....	51
4.2.	Analýza klinických vzorků pacientů s TGN	51
4.2.1.	Celková exprese genu <i>WT1</i> u germinálních nádorů varlat.....	51
4.2.2.	Změna expresního vzorce izoformem genu <i>WT1</i>	53
4.2.3.	Mutační analýza genu <i>WT1</i>	56
4.2.4.	Expresce proteinu WT1	57
4.2.5.	Expresce proteinu p53.....	58
4.2.6.	Mutační analýza genu <i>BRAF</i>	60
4.2.7.	Analýza mutací u patientských vzorků pomocí masivně-paralelního sekvenování ..	60
4.2.8.	Analýza mutací detekovaných NGS ve vybraných genech s potenciálním klinickým významem pro TGN (<i>BRAF</i> , <i>TP53</i> , <i>RAS</i> , <i>WT1</i> a <i>KIT</i>).....	63
4.2.9.	Analýza změn v počtech genových kopií (CNV) u patientských vzorků	66
5.	DISKUZE	69
6.	ZÁVĚR	76
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	78
8.	REFERENCE	81
9.	SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK	97
10.	PŘÍLOHY	99

Abstrakt

Testikulární germinální nádory (TGN) jsou poměrně vzácné solidní nádory dospělých. I tak postihují více než 700 mužů ročně v ČR, přičemž se většinou jedná o mladé pacienty ve věku 18-45 let. Velká část pacientů je vyléčitelná kombinací operace a chemoterapie, přesto zhruba 50 mužů ročně v ČR tomuto nádoru podlehnou, a to v naprosté většině případů následkem rozvoje rezistence na chemoterapii obsahující cisplatinu. Méně častý výskyt a vysoká kurabilita jsou patrně příčinou toho, že molekulárně biologické i klinické studie se u těchto nádorů provádějí relativně zřídka, a naše porozumění biologickým procesům vedoucím ke vzniku primárního nádoru a vývoji rezistence na cisplatinu (CDDP) je stále omezené. V současné době se v klinické praxi nepoužívají žádné specifické molekulárně-biologické vlastnosti TGN, které by mohly sloužit jako prognostické nebo prediktivní faktory a přispět k lepší stratifikaci pacientů a personalizaci léčby. V této práci jsme studovali molekulárně-genetické pozadí vývoje TGN a rezistence na CDDP na několika úrovních. Za účelem komplexního studia vzniku cisplatinové rezistence jsme se rozhodli připravit a sekvenovat CDDP-exponované TGN buněčné linie. Dlouhodobá expozice CDDP zvýšila rezistenci 10krát v buněčné linii NCCIT, zatímco u Tera-2 nebyla dosažena významná rezistence. Vývoj rezistence na CDDP byl doprovázen přechodným poklesem proliferace a změnami v buněčném cyklu - zvýšení G1 a snížení S-fракce v buněčné populaci. CDDP-rezistentní buňky NCCIT vykazovaly více získaných mutací (celkem 21, z toho 3 v genu *ATRX*), stejně tak i významné změny v genové expresi (např. *PAX5*). Analýza variací v počtu kopií (CNV - copy number variations) ukázala větší ztráty v počtech kopií více genů a několik duplikací v buňkách rezistentních na CDDP. Dále jsme u TGN zkoumali význam genu Wilmsova tumoru 1 (*WT1*), jelikož se jedná o transkripční faktor nezbytný pro vývoj a funkci varlat a jeho změny byly popsány v souvislosti s různými jinými malignitami, takže jsme předpokládali jeho potenciální roli i v patogenezi TGN. Kvantifikací celkové exprese *WT1* pomocí qPCR a jeho hlavních izoform u 105 TGN pacientů (114 nádorových vzorků a 100 kontrol) jsme prokázali významné snížení exprese *WT1* se signifikantním posunem k izoformám postrádajícím exon 5, které spolu s relativně vysokým výskytem *WT1* somatických mutací identifikují *WT1* jako nový potenciální faktor zapojený do patogeneze TGN, pravděpodobně jako tumor supresorový gen. U dalších 210 pacientů s TGN byla metodou qPCR detekována mutace *BRAF* V600E a tato byla identifikována pouze u 1 % pacientů, což nnesvědčí pro její význam ve vývoji TGN. Exprese proteinu p53 byla hodnocena imunohistochemicky, což ukázalo významné snížení exprese v metastázách ve

srovnání s původními nádory. Tyto výsledky mohou nasvědčovat roli p53 v metastatickém šíření u TGN. Naše práce dále zahrnuje sekvenační data z 31 vzorků primárních nádorů pacientů a párových kontrol. Zde byly nalezeny významné aberace více genů, přičemž nejvyšší počet mutací byl pozorován u pacientů, u kterých se vyvinula rezistence na CDDP. Jako zajímavou hodnotíme skutečnost, že u 2 pacientů byla detekována mutace v genu *ATRX*. Byly nalezeny i aberace ve vybraných genech při amplikonovém sekvenování, které mohou být důležité v biologii TGN - *TP53*, *MDM2*, *ATM*. Hodnotily se také *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *BRAF* a *WT1*. Náš výzkum zdůrazňuje molekulární změny související s vývojem rezistence na cisplatinu a identifikuje geny s potenciálními rolemi v tomto procesu.

Abstract

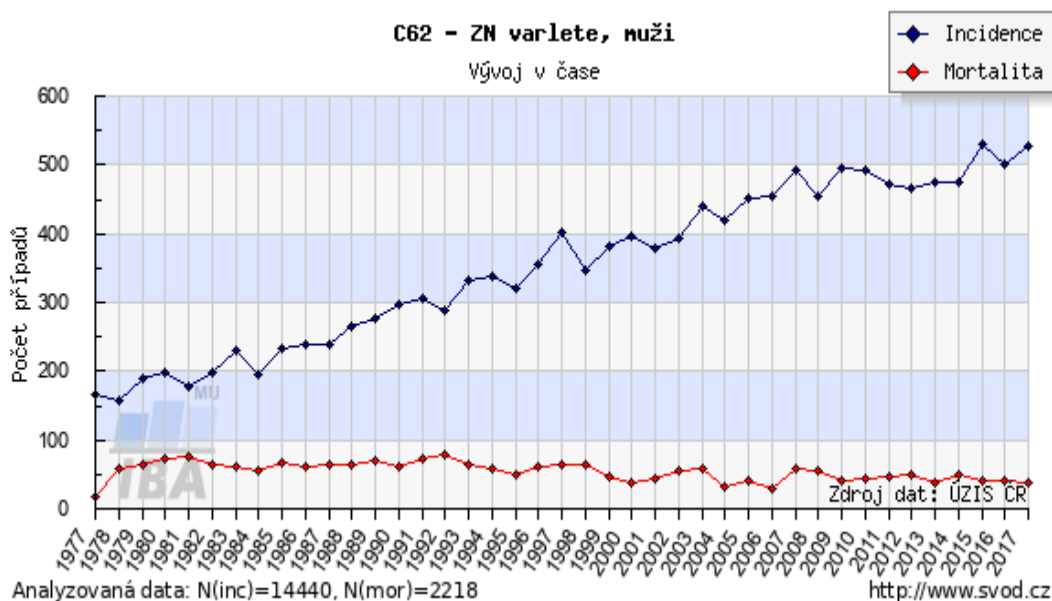
Testicular germinal tumors (TGCT) are relatively rare solid tumors in adults. Even so, they affect more than 700 men a year in the Czech Republic, mostly young patients aged 18-45 years. A large number of patients are curable by a combination of surgery and chemotherapy, yet about 50 men a year in the Czech Republic succumb to this tumor, in the vast majority of cases due to the development of resistance to chemotherapy containing cisplatin. The rare occurrence and high curability are probably the cause of infrequent molecular and clinical studies carried out in these tumors, and our understanding of the biological processes leading to primary tumor development and the development of cisplatin resistance (CDDP) is still limited. At present, no specific molecular markers that could be used as prognostic or predictive factors and improve patient stratification or treatment tailoring are available in TGCT management. In this work, we studied the molecular-genetic background of TGCT development and CDDP resistance at several levels. To comprehensively study the development of cisplatin resistance, we prepared and analyzed CDDP-exposed TGCT cell lines. Long-term exposure to CDDP increased resistance 10-fold in the NCCIT cell line, while no significant resistance was achieved with Tera-2. The development of CDDP resistance was accompanied by a transient decrease in proliferation and changes in the cell cycle - an increase in G1 and a decrease in S-fraction in the cell population. CDDP-resistant NCCIT cells showed more acquired mutations (a total of 21, including 3 in the *ATRX* gene), as well as significant changes in gene expression (eg. *PAX5* gene). Analysis of copy number variations (CNV) showed large losses in copy number of multiple genes and several duplications in CDDP-resistant cells. We further investigated the significance of Wilms' Tumor gene 1 (*WT1*) in TGCT as it is a transcription factor necessary for testicular development and function and its changes have been associated with various other malignancies, so we assumed its potential role in the pathogenesis of TGCT. Quantification of the expression of total *WT1* and its major isoforms by qPCR in 105 TGN patients (114 tumor samples and 100 controls) showed a significant decrease in *WT1* expression with a significant shift to the isoforms lacking exon 5, which, together with a relatively high incidence of *WT1* somatic mutations, identified *WT1* as a novel potential factor involved in the pathogenesis of TGCT, probably as a tumor suppressor gene. In a cohort of 210 patients with TGCT, the *BRAF* V600E mutation was detected by qPCR, and this was identified in only 1 % of patients, suggesting its no significance in TGCT development. Expression of the p53 protein was assessed by immunohistochemistry, demonstrating a

significant decrease of expression in metastases compared to the original tumors. These results may suggest a role for p53 in the metastatic spread in TGCT. Our work further includes sequencing data from 31 patient primary tumor samples and paired controls. There were significant aberrations of multiple genes found, with the highest number of mutations being observed in patients who developed CDDP resistance. Interestingly, in 2 patients a mutation in the *ATRX* gene was detected. Aberrations were also found in selected genes during amplicon sequencing, which may be important in the biology of TGCT – e.g. *ATM*, *WT1* and *RAS* genes. Our research highlights molecular aberrations related to the development of cisplatin resistance or the pathogenesis of TGCT, some of which may be implicated in the clinical practice in the future.

1. Literární přehled

1.1. Testikulární germinální nádory

Testikulární germinální nádory (TGN) jsou poměrně raritní nádory, nejpočetněji se vyskytující ve věkové skupině 18-45 let a tvoří asi 1-2 % všech nádorů u mužů (Bosl and Motzer, 1997; Oliver, 1997). Studie z roku 2008 dokumentují 52 000 nových případů TGN ročně a až 9 000 úmrtí na tento druh nádoru celosvětově (Ferlay *et al.*, 2010). Pro Českou republiku to znamená více než 500 nových případů ročně z nejnovějších statistik pro rok 2017 (Obr. 1). Incidence TGN má stoupající trend v posledních 30-40 letech a příčiny tohoto zvyšování nejsou objasněny. V pracích z roku 2014 byl popsán 75% vzestup výskytu TGN z 2,9/100 000 v roce 1975 na 5,1/100 000 v roce 2004 (Parkin *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2008). Dle nejnovějších analýz byla celosvětově mírně stoupající incidence TGN z 52 322 případů zazamenaných v roce 2008 na 55 266 případů pro rok 2012 dále potvrzena, přičemž poměr incidence vs. mortalita byl snížený. To svědčí jak pro zdokonalenou diagnostiku, tak pro lepší léčbu těchto nádorů (Park *et al.*, 2018). Stejný trend se potrzuje i pro Českou republiku (Obr. 1). Současně se ukazuje, že se také vyrovnává výskyt tohoto nádoru z hlediska zemí s nízkou a vysokou incidencí v rámci Evropy, což je výsledkem mírného zvyšování výskytu v zemích s nízkou incidencí za současného ustalování v zemích s tradičně nejvyšší incidencí. Tato je i nadále nejvyšší v Dánsku a Norsku (Gurney *et al.*, 2019).



Obrázek 1. Incidence a mortalita TGN v České republice. Zdroj: www.svod.cz

Známý je i fakt výrazně se lišícího počtu těchto nádorů v rámci různých etnik a národností. Jako nejvyšší je výskyt TGN dokumentován u Evropanů a mezi obyvateli USA a Austrálie s evropskými kořeny, kdy data z USA dokládají 6,9 případů na 100 000 obyvatel u obyvatel s evropskými kořeny v porovnání s 1,2 případy na 100 000 obyvatel u Afroameričanů (Ghazarian *et al.*, 2015). V rámci evropského kontinentu je incidence nejvyšší u Dánů (15,4 případů na 100 000 obyvatel), dále u Švédů a Norů, kde je dvojnásobně vyšší incidence v porovnání s Finskem a ostatními evropskými státy. Některé studie zabývající se tímto zajímavým faktem poukazují na možnost existence faktorů zevního prostředí, které by se mohly podílet na vzniku TGN. Mezi nejvíce pravděpodobné, ne však podpořené dostatečně silnými důkazy, se zdá narušení endogenní hormonální signalizace v průběhu prenatálního vývoje xenobiotiky, obecněji lze tyto látky označit za endokrinní disruptory narušující přirozenou hormonální rovnováhu. Působení těchto látek je nejčastěji spojováno s příznaky, jako jsou kryptochorismus, hypospadie, nízký počet spermií a germinální nádory (Skakkebaek, Rajpert-De Meyts and Main, 2001; Giannandrea and Fargnoli, 2017b, 2017a). Studie zabývající se vlivem faktorů zevního prostředí na vznik TGN se opírají o evidence zvýšeného výskytu TGN u druhé generace migrantů žijících v Dánsku, kde je incidence TGN celosvětově nejvyšší. Obecně platilo, že u dětí narozených v prostředí s vyšším výskytem TGN, měly tyto vyšší riziko vzniku tohoto nádoru než jejich otcové, zatímco u první generace přistěhovalců nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v incidenci TGN. U dalších studií nebyla dosažena dostatečná míra statistické signifikance pro jasnou evidenci vlivu faktorů zevního prostředí na vznik TGN. (K Hemminki and Li, 2002; Kari Hemminki and Li, 2002; Ekbohm *et al.*, 2003; Montgomery *et al.*, 2005; Schmiedel *et al.*, 2010).

Kromě faktorů zevního prostředí hrají v rozvoji TGN bezesporu roli i faktory genetické. Přes dokumentovaný nejvyšší podíl familiární predispozice u TGN v porovnání s ostatními solidními nádory, kdy je u syna a bratra postiženého tímto nádorem zvýšené riziko výskytu 4-6x a 8-10x, respektive, žádné konkrétní geny či skupiny genů s přímým vlivem na vznik TGN nebyly zatím identifikovány (Parkin and Iscovich, 1997; Ekbohm *et al.*, 2003; Montgomery *et al.*, 2005; McIntyre *et al.*, 2008). U mužů s již diagnostikovaným TGN existuje zvýšené riziko vzniku nádoru v druhém varletu, kdy přibližně u 2 % z nich byl dokumentován kontralaterální nádor v horizontu 15 let od první diagnózy (Fosså *et al.*, 2005). Až v posledních letech bylo za použití moderních sekvenovacích metod a databází srovnávajících velké množství dat určeno několik lokusů s rizikem pro vznik TGN. Tyto nové studie se zabývají hledáním polymorfismů v genomu typických pro TGN a potažmo určením genů a genových lokusů, které v důsledku vzájemné interakce mohou přispět ke vzniku TGN.

Bylo tak identifikováno 19 nových genových lokusů s pravděpodobnou rolí při vzniku TGN. Většinou se jedná o transkripční faktory, jejichž funkce byla aberantně narušena, což autoři interpretují jako potvrzení teorie o narušeném procesu diferenciaci u primordiálních germinálních buněk (PGB). Dále byly nalezeny souvislosti svědčící o narušené funkci mikrotubulů a dysregulaci dráhy *KIT-MAPK* (Litchfield *et al.*, 2015, 2016, 2017, 2018; Wang *et al.*, 2017a, 2017b). Výsledky z genomických studií (GWAS; genome-wide association study) ukazují, že jednonukleotidové polymorfismy (SNP neboli varianty jediné báze), které byly identifikovány v různých lokusech genů, jsou odpovědné za přibližně 15 % genetické predispozice k tvorbě TGN. Tyto polymorfismy byly identifikovány v genu *KITL/SCF* a dalších – např. v genu pro známý inhibitor apoptózy *BAK1*, v genu *DMRT1* zodpovědném za diferenciaci testikulárních buněk a genu *SPRY4*, který společně s *BAK1* ovlivňuje signální dráhu *KIT/KITL*. Podle dalších genetických analýz byly homozygotní delece nalezeny v několika nádorových supresorových genech, jako jsou *RBI*, *NME*, *WT1*, *APC* a *CDKN2A*, ale tyto výsledky nebyly potvrzeny jinými funkčními studiemi (Oosterhuis and Looijenga, 2003; Skotheim and Lothe, 2003; Turnbull and Rahman, 2011).

Unikátní vlastností TGN je jejich velice dobrá odpověď na léčbu cisplatinou, která může v kombinovaných chemoterapeutických režimech navodit remisi až u 90 % pacientů. Tato výjimečná citlivost je mimo jiné i důsledkem přítomnosti nemutovaného genu *TP53*, jehož mutace se naopak řadí k nejčastějším u většiny solidních nádorů (Bagrodia *et al.*, 2016). Bohužel pro 10 % pacientů s chemorezistentním nádorem neexistuje další efektivní léčba a tito pacienti kvůli rozvoji rezistence na cisplatinu umírají. TGN je nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění u mužů ve věkové skupině 18-45 let (Bahrami, Ro and Ayala, 2007; Shanmugalingam *et al.*, 2013).

Dle klinických, epidemiologických a histologických kritérií lze TGN dělit do tří skupin: 1. teratomy a nádory ze žlutkového váčku pediatrických pacientů, 2. TGN (seminomy i neseminomy) postpubertálních pacientů, 3. spermatocytické seminomy, které vznikají v pozdějším věku (Reuter, 2005) (Tab. 1). Tato práce se věnuje druhé skupině TGN, které tvoří 98 % všech neoplázií vznikajících v testikulární tkáni.

Tabulka 1. Základní charakteristiky TGN. Převzato a upraveno dle (Reuter, 2005).

Věk	Histologie	Incidence na 100 000 obyvatel	Genetické abnormality	Ploidita	Rizikové faktory
prepubertální	teratomy, nádory ze žloutkového váčku	0,12	-1p; -6q	diploidní; aneuploidní	etnický původ, genetické/rodinné predispozice, infertilita, kryptorchismus, dysgeneze pohlavních orgánů, androgenní insenzitivita
postpubertální	seminomy, neseminomy	6,0	GCNIS; i(12p)	hypertriploidní: GCNIS a seminomy; hypotriploidní: neseminomy	
starší 40 let	spermatocytární seminomy	0,2	+9	tetraploidní/ diploidní	

(GCNIS – germ cell neoplasia *in situ*)

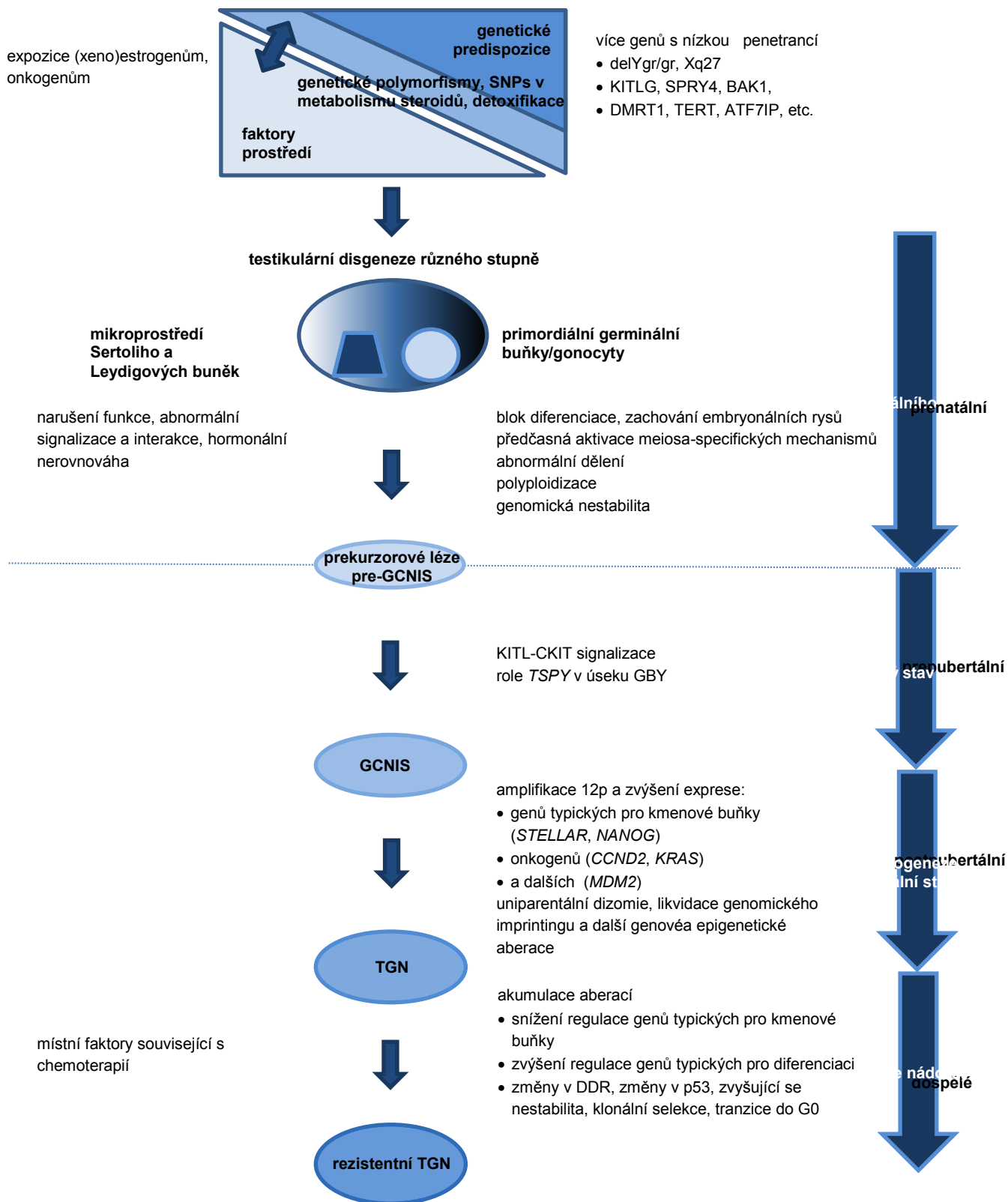
1.2. Vznik a vývoj TGN

TGN vznikají maligní transformací testikulárních germinálních buněk. V několika studiích byla dokumentována existence atypických lézí v histologických preparátech z tkání pacientů s TGN, o nichž se předpokládalo, že jejich vznik je důsledkem maligní transformace (Azzopardi, Mostofi and Theiss, 1961; Mark and Hedinger, 1965). V roce 1972 byla prvně vyslovena hypotéza, že tyto léze, které profesor Skakkebaek pozoroval v preparátech z biopsií varlat infertilních mužů, mohou být prvním stádiem vzniku TGN. Léze byly pojmenovány Germ Cell Neoplasia in Situ (GCNIS) (Skakkebaek, 1972).

Na molekulární úrovni se pravděpodobně jedná o procesy začínající již v prenatálním období u primordiálních germinálních buněk (PGB), které jsou zablokované ve svém vývoji. PGB vznikají z epiblastu a dále migrují do genitálních lišt, kde dávají vznik gonocytům. Tato jejich migrace je pod kontrolou signalizace *KIT/KITL* a takto vzniklé nezralé gonocyty jsou typické svojí vysokou expresí markerů kmenových buněk a faktorů určujících pluripotenci (*POU5F1*, *NANOG*, *KIT*, *TFAP2C*) (Robinson, 2001; C. E. Høe-Hansen *et al.*, 2004; Christina E. Høe-Hansen *et al.*, 2004; Gaskell *et al.*, 2004). PGB tvoří v genitálních lištách bipotentní gonády, kde je jejich další vývoj určen vlivem podpůrných buněk z jejich okolí. V případě mužských gonád je pro další vývoj nutná přítomnost transkripčního faktoru *SRY*,

exprimovaného z genu na chromozomu Y. Tento transkripční faktor řídí expresi dalšího nezbytného transkripčního faktoru *SOX9*, který reguluje vývoj Sertolihových buněk, nutných pro vývoj testikulární tkáně a pro diferenciaci PGB v spermatogonie. Během diferenciace ztrácí PGB expresi pluripotentních markerů (*KIT*, *NANOG*, *OCT3/4*) a začínají exprimovat geny typické pro diferencované buňky (*VASA*, *MAGE-4A*, *TSPY*). Tyto procesy jsou regulovány epigenetickými mechanismy a pravděpodobně i molekulami mikroRNA. Předpokládá se, že narušení složitého procesu signalizace vede ke vzniku maligně transformovaných germinálních buněk, které jsou zablokované ve vývoji a vykazují vysoké hladiny exprese pluripotentních markerů a svým genomickým imprintingem odpovídají méně zralým buněčným stádiím. DNA fetálních germinálních buněk je hypometylovaná a čím více se tyto buňky diferencují, tím více stoupá i stupeň methylace jejich DNA. To koreluje i s chemorezistencí na cisplatinu u nádorů vzniklých z různě diferencovaných stádií těchto buněk. Obecně platí, že s mírou diferenciace klesá odpověď na cisplatinu, což je výsledkem mnoha klinických prací ukazujících velice dobrou odpověď na léčbu cisplatinou u seminomů (vznikajících z nediferencovaných germinálních buněk), klesající odpověď u neseminomů a rezistenci u teratomů, u nichž je největší míra methylace i diferenciace (Krege *et al.*, 2008b, 2008a; Wermann *et al.*, 2010). Wermann *et al.* dále ve své práci zkoumali experimentálně účinek demethylačního činidla 5-azacytidinu na diferenciační stádium buněk TGN a jejich rezistenci na cisplatinu, kdy se demethylací obnovila zvýšená exprese pluripotentních markerů (*NANOG*, *OCT3/4*) a došlo také k zvýšení cytotoxicity navozené cisplatinou (Wermann *et al.*, 2010).

Vznik nádoru je pravděpodobně podmíněn několika dílčími zásahy, které vedou ke vzniku mutací v různých genech regulujících procesy, jako jsou buněčná diferenciace, proliferace a regulace buněčného cyklu (Obr. 2) (Boublikova *et al.*, 2014). Zajímavá je otázka načasování prvního kroku nádorové transformace, tedy zda maligní transformace nastává před nebo po vycestování PGB ze žlutkového vaku do genitálních lišt. Ze studií zaměřujících se na danou problematiku vyplynulo, že u bilaterálních TGN neexistuje jedna společná původní mutace, což podporuje hypotézu vzniku různých mutací ve více genech, které nastávají nezávisle na sobě až po vycestování PGB do genitálních lišt (Brabrand *et al.*, 2015).



Obrázek 2: Shrnutí procesů pravděpodobně vedoucích k maligní transformaci u testikulárních germinálních nádorů (TGN). Převzato a upraveno z (Boublikova *et al.*, 2014).

Maligní transformace pokračuje postnatálně a vede ke vzniku již zmíněného prekursorového stádia tzv. *in situ* léze (GCNIS). Tato byla dokumentována u 90 % TGN a znamenala 50% riziko vzniku TGN v horizontu 5 let (Rajpert-De Meyts, 2006). Stádium invazivního nádoru s maligním charakterem nastává většinou po pubertě, což svědčí o hormonálním ovlivnění TGN.

S rozvojem invazivního nádoru je u TGN vždy spojena přítomnost izochromozomu i(12p), který pravděpodobně vzniká duplikací a jeho přítomnost nebyla detekována u prekursorového stádia testikulárních germinálních nádorů – GCNIS. Následkem této duplikace je zvýšení genové dávky genů nacházejících se na krátkém raménku chromozomu 12, mezi nimi např. *SOX5*, *CCND2*, *NANOG*, *KRAS* a další. Některé z nich patrně hrají zásadní roli při vzniku TGN. Produktem genu *CCND2* je cyklin D a jeho zvýšená exprese je nezbytná pro vstup diferencovanějších buněk zpět do buněčného cyklu, což má za následek jejich genetickou nestabilitu a vznik polyploidizace (Skakkebaek *et al.*, 1987; Houldsworth *et al.*, 1997; Looijenga *et al.*, 2011). Klíčový pro vznik TGN je pravděpodobně i gen *NANOG*, hrající roli při zachování zárodečného charakteru buňky. Jeho zvýšená exprese byla nalezena u primárních TGN, ale ne u metastáz již rezistentních germinálních nádorů. Jako kauzální pro vznik invazivního germinálního nádoru se na základě mnoha studií jeví i onkogen *KRAS*. V pracích zabývajících vznikem TGN byla mutace v genu *KRAS* nalezena pouze u invazivního nádoru a nenacházela se u žádného z pacientů v dřívěji odebrané germinální tkáni ve fázi GCNIS přeměny (Roelofs *et al.*, 2000; Skotheim *et al.*, 2003).

Nově se v patogenezi TGN popisuje jako významná událost reciproká ztráta heterozygoty. Podstata tohoto děje spočívá v duplikaci na úrovni chromozomů nebo jejich částí, které tímto kompenzují ztrátu genové informace z druhé rodičovské alely. Ve většině případů dochází ke kompenzaci genové dávky, nejsou však výjimkou i případy, kdy tímto způsobem dojde k nekompenzované duplikaci, jejímž důsledkem vznikají tři kopie některých genů. U TGN dochází také k relativně častým delecím, které nejsou vždy kompenzovány reciproční duplikací v rámci oprav takto poškozeného genomu (Taylor-Weiner *et al.*, 2016).

Nezbytným faktorem pro vývoj časných fází TGN je aktivace dráhy *KIT/KITLG* (*SCF*), která působí jako dominantní signální dráha v patogenezi TGN. Tato dráha signalizuje prostřednictvím cytokinového receptoru KIT, který po vazbě ligandu (*KITLG/SCF*) spouští signalizační kaskádu, jež reguluje proliferaci, migraci a přežití krvetvorných buněk, melanocytů a zárodečných buněk. Somatické mutace a narušená exprese genu *KIT* byly detekovány u mnoha malignit včetně nádorů varlat. Duplikace genomické oblasti 4q12 obsahující *KIT* je obvykle spojena se vznikem seminomů. Inhibitor signalizace KIT (imatinib)

prokázal významné snížení této signalizace v seminomech s nadměrně exprimovaným receptorem KIT a tendenci k redukci metastazujících seminomů u pacientů, jimž byl tento inhibitor podáván. Další možnost regulace dráhy *KIT/KITLG* (SCF) vyplynula ze studie zabývající se přítomností SNPs ve vazebné doméně KITLG pro vazbu proteinu p53. Tato studie vysvětluje vznik a proliferaci nádorových buněk TGN i v přítomnosti nemutovaného proteinu p53, kdy polymorfismy ve vazebné doméně pro molekulu p53 při jeho vazbě na KITLG jsou zodpovědné za zvýšenou expresi KITLG, která vede k zvýšené buněčné proliferaci. (Ashman, 1999; Rapley *et al.*, 2004; Runyan *et al.*, 2006; Biermann *et al.*, 2007; Pedersini *et al.*, 2007; Coffey *et al.*, 2008; Gilbert, Rapley and Shipley, 2011; Zeron-Medina *et al.*, 2013).

Pomocí moderních srovnávacích metod bylo dále v rámci genomických studií na rozsáhlých souborech pacientů identifikováno několik dalších genů s potenciálním vlivem na vývoj TGN: geny s telomerázovou aktivitou jako například *TERT-CLPTMIL* (5p15) a s nimi asociované geny *ATF7IP* (12p13) a *PITXI* (5q31), které svojí společnou aktivitou tvoří krátké nukleotidové sekvence na koncích chromozomů. Aktivita lidské telomerázy reverzní transkriptázy (hTERT) není obvyklá u somatických buněk, ale její aktivita je pozorována až u 90 % nádorových buněk. V případě TGN byla vysoká aktivita hTERT dokumentována u teratomů, kde by mohla mít význam pro subklasifikaci nádorů a prognózu pacientů (Schrader *et al.*, 2002).

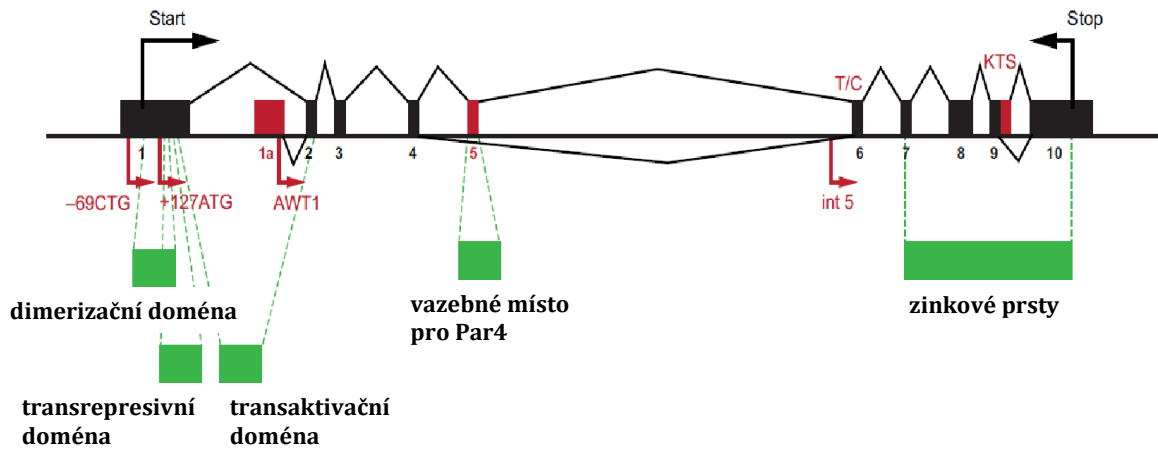
Diskutabilní zůstává role mikroRNA ve vzniku a vývoji TGN a procesu získávání chemorezistence. U mnoha buněčných dějů byla prokázána signifikantní role těchto jednořetězcových nekódujících molekul RNA, většinou se jedná o vazbu na molekuly mRNA a kontrolu jejich translace. U TGN byla zjištěna zvýšená exprese miR-372 a miR-373, které ve svém účinku inhibovaly tumorsupresorové geny *LATS2* a *NEO I*, jež se účastní dráhy p53 (Duale *et al.*, 2007; Voorhoeve *et al.*, 2007; Li, Ren and Tang, 2014). Některé miRNA by mohly mít reálné klinické využití pro monitorování onemocnění a včasnou detekci relapsu u pacientů s TGN. Za takové byly označeny miR-375 a miR-371, přičemž exprese miR-371 je vysoká u seminomů a embryonálních karcinomů a exprese miR-375 je zvýšená u teratomů a nádorů pocházejících z buněk žloutkového váčku (Duale *et al.*, 2007; Voorhoeve *et al.*, 2007; Li, Ren and Tang, 2014).

1.3. Gen *WT1* a jeho role při vzniku TGN

Gen Wilmsova tumoru 1 (*WT1*) byl prvně identifikován v roce 1990 jako gen zodpovědný za vznik Wilmsova tumoru. Toto nádorové onemocnění postihuje 1 z 10 000 dětí

a gen *WT1* je mutovaný u 5-10 % všech případů (Little and Wells, 1997; Charlton and Pritchard-Jones, 2016). Úsek kódující *WT1* se nachází na chromozomu 11p13. Zpočátku se předpokládalo, že se tento gen chová jako tumor supresorový gen, kdy pro vznik nádoru bylo potřeba, aby jeho obě alely byly mutovány a nemohly plnit svoji funkci (Knudson and Strong, 1972). Následným výzkumem bylo zjištěno, že v mnoha jiných nádorech je exprese genu *WT1* zvýšená a tudíž působí v těchto případech jako onkogen.

Gen *WT1* kóduje protein o velikosti přibližně 57 kD, který se může vyskytovat až v 36 izoformách, vznikajících alternativním sestřihem i alternativním místem začátku translace, případně úpravami RNA nebo i kombinací těchto procesů. I přes mnohé odlišnosti obsahují všechny izoformy genu *WT1* čtyři C2H2 Kruppel-like zinkové prsty (Obr. 3) (Hastie, 2017). Čtyři hlavní izoformy *WT1* jsou charakterizované přítomností nebo nepřítomností exonu 5 (obsahujícího 17 aminokyselin) a tzv. fragmentu KTS na konci exonu 9 (kódujícího 3 aminokyseliny mezi 3. a 4. Zn prstem) (Obr. 4). Protein WT1 je transkripční faktor. Specifické funkce a význam většiny izoform WT1 však nejsou známy. Je známo, že mutace způsobující změnu čtecího rámce v oblasti zinkových prstů vedoucí k převaze izoform KTS- se vyskytují u pacientů s Frasierovým syndromem, jehož příznaky jsou kryptochorismus, syndaktilie a abnormality ledvin (Barboux *et al.*, 1997; Klamt *et al.*, 1998). Studie provedené na myším modelu prokazují důležitost správné proporce izoform *WT1*, kdy jejich uměle navozená alterovaná exprese vedla k poruchám vývoje ledvin. Další pokusy na myších ukázaly, že při ztrátě izoform KTS- nebo KTS+ docházelo k úmrtí takto modifikovaných myší z důvodu opožděného vývoje ledvin (Hammes *et al.*, 2001). Z dalších studií však vyplynulo, že myší modely, kterým chyběly oblasti genu *WT1* obsahující 17 nukleotidový úsek kódovaný exonem 5, nevykazovaly známky postižení (Natoli *et al.*, 2002). Toto zjištění bylo pro autory zajímavé z hlediska toho, že je známo, že transkript vznikající jako produkt exonu 5 je nutný pro interakci proteinu WT1 s apoptózu-regulujícím faktorem PAR4 (Richard *et al.*, 2001) a mutace v tomto úseku byly nalezeny u případů Wilmsova tumoru (Schumacher *et al.*, 1998). Z tohoto hlediska je spíše pravděpodobné, že exon 5 je prokazatelně důležitou částí genu *WT1* u lidí.

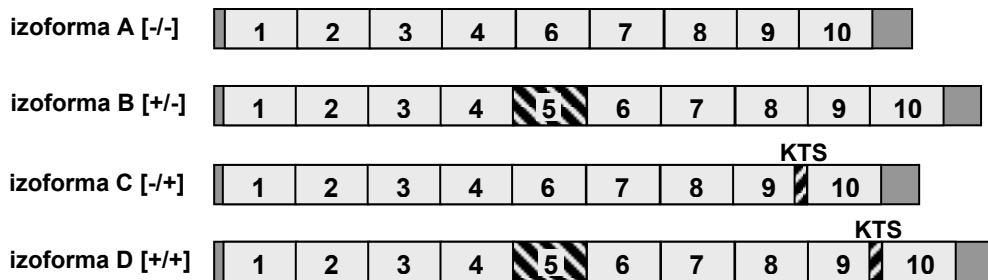


Obrázek 3. Struktura genu *WT1* u savců. Variantní místa transkripce a translace, alternativní sestřihy a RNA editační místa v savčím genu *WT1* jsou zobrazena červeně; tyto mohou vést k nejméně 36 potenciálním savčím izoformám *WT1*. int 5 (intron 5). Převzato z (Hastie, 2017).

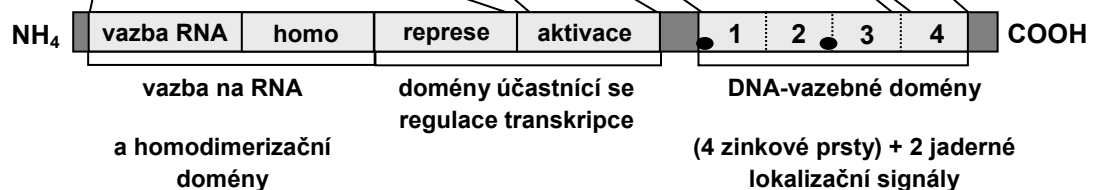
DNA WT1 11p13 (NM 024426.4)



mRNA WT1 - izoformy (varianty)



protein WT1



Obrázek 4. Struktura genu *WT1* a čtyř hlavních izoform. Alternativní místa sestřihu jsou značena šrafovane, černé šipky označují alternativní místa iniciace transkripce. Převzato z (Kramarzova *et al.*, 2012).

V literatuře existuje několik dobře popsaných syndromů vznikajících v důsledku hemizigoty či mutace v genu *WT1*. Delece v tomto genu jsou zodpovědné za vznik syndromu WAGR, projevujícího se Wilmsovým tumorem u 70 % postižených, anridií, mentální retardací a anomáliemi v genitálním ústrojí. Většinou se jedná o nesestouplá varlata u mužů nebo o proužkovité gonády a abnormálně tvarovanou dělohu u žen (Riccardi *et al.*, 1978). Dalším popsaným syndromem vztahujícím se ke genu *WT1* je Denys-Drashův syndrom, za který je zodpovědná heterozygotní mutace v části genu kódující zinkové prsty. Toto onemocnění se obvykle projevuje vážnějším fenotypem poruchy vývoje pohlavních orgánů (obojetné zevní pohlavní orgány), selháváním ledvin, vznikem nefrotického syndromu a častým výskytem Wilmsova tumoru. Při studiu *in vitro* proteinových interakcí byla dokumentována interakce nefunkčního proteinu WT1 s jeho funkčním protějškem vznikajícím z nemutované alely, což může vysvětlovat závažnost projevů i přesto, že způsobující mutace je pouze jednobodová a heterozygotní (Little *et al.*, 1995).

Transkripční faktor WT1 je zcela nezbytný při vývoji urogenitálního systému a gonád. V embryogenezi je *WT1* klíčový při určení pohlaví, jelikož interaguje s geny *SRY* a *SOX9* na chromozomu Y, které jsou nezbytné pro tvorbu mužských pohlavních orgánů (Bowles and Koopman, 2001). Studie na myších modelech ukázaly klíčovou roli exprese *WT1* a to i z hlediska izoform tohoto genu, kdy úplná ztráta exprese *WT1* vedla k absenci ledvin a urogenitálních orgánů u dané myši (Kreidberg *et al.*, 1993). Další pokusy ukázaly, že úplná absence izoformy KTS+ genu *WT1* vedla u myši ke vzniku fenotypu odpovídajícímu Frasierovu syndromu u lidí. Postnatálně je role *WT1* také podstatná, jelikož se podílí na spermatogenezi a jeho exprese je vysoká jak u germinálních buněk, tak i v Sertoliho buňkách.

Význam genu *WT1* u TGN nebyl doposud objasněn. Známa a dobře prozkoumaná je však role *WT1* v hematopoéze a leukemogenezi, kde *WT1* hraje roli při diferenciaci a proliferaci hematopoetických buněk. Exprese *WT1* je vysoká u primitivních CD34+ hematopoetických buněčných prekurzorů a tato vysoká exprese je potlačena při procesu diferenciaci. *WT1* není exprimován v hematologických buňkách z erythroidní a megakaryocytární linie (Baird and Simmons, 1997; Hosen *et al.*, 2002).

Mutace v genu *WT1* byly nalezeny u 9-13 % akutních myeloidních leukémií a u 20 % bifenotypických leukémií, zatímco jejich výskyt u akutních lymfoblastických leukémií je sporadický. Nebyl prokázán rozdíl ve výskytu *WT1* mutací mezi leukémiemi u dospělých a v dětském věku. Všechny takto nalezené mutace byly typu tzv. missense, které ve svém důsledku měly za následek zkrácení proteinu WT1 a změny v sekvenci zinkových prstů s

neschopností takto změněného proteinu vázat se na DNA. Popsané mutace se v naprosté většině případů vyskytovaly v exonech 7 a 9, které jsou označovány za tzv. hot-spot mutační místa v sekvenci genu *WT1*. Dalším efektem takto vzniklé mutace, která je ve většině případů heterozygotní, může být narušení procesu dimerizace, kdy mutovaný protějšek může interagovat s nemutovaným proteinem a touto interakcí způsobit plnou inaktivaci vzniklého dimeru, což je popsáno jako tzv. loss-of-function mutation a je jednou z možných variant působení mutovaného *WT1* jakožto onkogenu (Pritchard-Jones, Renshaw and King-Underwood, 1994; King-Underwood, Renshaw and Pritchard-Jones, 1996; Algar *et al.*, 1997; Carapeti, Goldman and Cross, 1997; English and Licht, 1999; Miyagawa *et al.*, 1999; Ariyaratana and Loeb, 2007; Summers *et al.*, 2007; Virappane *et al.*, 2008; Paschka *et al.*, 2008; Renneville *et al.*, 2009; Gaidzik *et al.*, 2009; Krauth *et al.*, 2015). Kromě mutací byly u akutních leukémií popsány i změny exprese *WT1* a jeho izoforem, které byly ve studiích asociovány s prognózou pacientů (Boublikova *et al.*, 2006; Kramarzova *et al.*, 2012).

U TGN byl gen *WT1* studován minimálně. V malé studii byla prokázána zvýšená exprese *WT1* u nádorů v pokročilém stádiu a nezměněná exprese u nepokročilých nádorů. Nebyla zjištěna rozdílná exprese mezi základními podtypy TGN seminomy vs. neseminomy (Horada Y *et al.*, 1993, Nonomura N. *et al.*, 1999). Vzhledem k významné roli proteinu WT1 ve vývoji varlete a jeho předpokládanému charakteru tumor supresorového genu lze předpokládat, že se *WT1* a jeho aberace mohou zásadním způsobem podílet i na patogenezi TGN.

1.4. Léčba TGN

Základní léčba TGN je chirurgická – orchiektomie. U pacientů s rizikovým nálezem nebo při prokázaném metastatickém postižení následuje kombinovaná chemoterapie obsahující cisplatinu. Vysoká senzitivita TGN k cisplatině a jejím derivátům je příčinou vysoké úspěšnosti léčby pacientů s TGN, až 95 % pacientů se dostane do dlouhodobé kompletní remise. Přibližně u 5 % všech a 10-20 % pacientů s metastatickým nádorem se ale vyskytuje primární nebo léčbou navozená rezistence na cisplatinu. U nich jsou možnosti další léčby většinou velmi omezené a jejich prognóza je nepříznivá (Albers *et al.*, 2015; Oldenburg *et al.*, 2015). S rezistencí TGN na cisplatinu je spojována změna v buněčné odpovědi na poškození DNA. Místo původně preferované aktivace proapoptotických drah se obnovuje klasická signalizace p53 umožňující zástavu buněčného cyklu a reparaci poškození DNA (Fenske *et al.*, 2012). S rezistencí TGN je spojována i vysoká cytoplasmická hladina proteinu p21, který působí jako inhibitor cyklin dependentní kinázy (CDK2) (Koster *et al.*, 2010).

Mění se i hladiny apoptózu-regulujících faktorů - zvýšená hladina antiapoptotického proteinu Bcl-2 byla prokázána např. u rezistentních teratomů, což se sníženou hladinou obecně silně exprimovaného proapoptotického proteinu BAX může vést k rozvoji rezistence na cisplatinu (Chresta, Masters and Hickman, 1996; Baltaci *et al.*, 2001) I když u mnoha nádorů je již v dnešní době vyvinut postup pro léčbu pokročilých fází nebo refrakterních nádorů, TGN mezi ně nepatří. Není zde ustálený žádný standardní režim pro léčbu rezistentních nádorů a většina takto postižených pacientů umírá. V posledních 15 letech bylo provedeno několik pokusů o zavedení cílené terapie TGN, avšak s neuspokojivým výsledkem. Byl testován např. účinek několika inhibitorů tyrozinkináz (sorafenib, sunitinib, pazopanib, bevacizumab), jejich efekt však nebyl dokumentován jako významný. Zaznamenaná odpověď dosahovala 10 %, stejných výsledků bylo dosaženo i s použitím inhibitoru mikrotubulů cabazitaxelu, který se využívá při léčbě nádorů prostaty (Oechsle *et al.*, 2011b; Jain *et al.*, 2013; Skoneczna *et al.*, 2014; Necchi *et al.*, 2017; Oing *et al.*, 2019). Další experimentální postupy se zaměřily k nalezení látek ovlivňujících protinádorovou imunitu. Jedná se o specifické protilátky vázající se na molekulu CD30, která je výlučně exprimovaná na povrchu buněk embryonálních karcinomů. Tento přístup dosud ukázal nejslibnější výsledky, kdy odpověď byla zaznamenána u 2 z 9 pacientů v rámci probíhající studie (Necchi *et al.*, 2016; Albany *et al.*, 2018).

2. Cíle a hypotézy

- 1. Příprava chemosenzitivních a odvozených chemorezistentních linií z původních testikulárních germinálních buněčných linií**
- 2. Hodnocení a porovnání jejich vlastností s ohledem na získání rezistence na cisplatinu – hodnocení proliferace, buněčného cyklu, změn genové exprese a mutací v DNA detekovaných metodou celoexomového a transkriptomového masivně-paralelního sekvenování**
- 3. Stanovení hladiny celkové exprese genu *WT1* a stanovení expresního profilu čtyř hlavních izoforem *WT1* v klinických vzorcích a testikulárních buněčných liniích**
- 4. Detekce mutací v genu *WT1* v klinických vzorcích a testikulárních buněčných liniích**
- 5. Detekce mutací vybraných genů (*BRAF*, *TP53*, *RAS* a *KIT*) s potenciálním klinickým významem pro TGN v klinických vzorcích a testikulárních buněčných liniích**
- 6. Skrínink mutací v dalších genech asociovaných s nádory metodou amplikonového a celoexomového masivně-paralelního sekvenování v klinických vzorcích**
- 7. Analýza dat získaných masivně paralelním sekvenováním a jejich interpretace.**
- 8. Statistické zpracování dat a korelace výsledků s klinickými údaji pacientů.**

3. Materiál a metody

3.1. Pacientské vzorky

Pacientské vzorky byly získány od pacientů léčených v Thomayerově nemocnici v Praze a od pacientů z dalších pražských nemocnic po schválení studie příslušnými etickými komisemi a po získání informovaného souhlasu pacientů. Pacienti byli do studie zařazováni především prospektivně, nicméně vzhledem k tomu, že se jedná o nádor s nízkou incidencí, byly další vzorky dohledány a zařazeny retrospektivně.

Stanovení exprese *WT1* bylo provedeno u 105 pacientů (114 vzorků čerstvě zmražených testikulárních nádorů a 100 kontrolních vzorků), přičemž byly jako kontrolní vzorky použity jak zdravá tkáň nacházející se v okolí tumoru, tak i vzorky periferní krve daného pacienta. Mutace *BRAF* 1799T>A (V600E) byla vyšetřena u 210 pacientů/vzorků testikulárních nádorů, čerstvě zamražených i fixovaných v parafínu. Podrobné charakteristiky pacientů jsou v Tab. 2.

Expresy proteinů p53 a WT1 byly detekované jen ve vzorcích fixovaných v parafínu. Protein p53 byl detekován u 202 primárních a 118 metastatických nádorů dohledaných retrospektivně.

Vybraní pacienti s dostupnými vzorky čerstvě zmražených testikulárních nádorů a nenádorových kontrol (okolní nenádorová tkáň nebo periferní krev) byli sekvenováni metodou sekvenování nové generace (NGS), z toho 4 pacienti na úrovni celoxomového sekvenování (WES – whole exome sequencing) a 27 pacientů na úrovni amplikového sekvenování s použitím rozšířeného panelu genů vztahovaných k nádorovým onemocněním. Podrobné charakteristiky sekvenovaných pacientů jsou v Tab. 3.

Jako další kontroly byly použity vzorky pacientů po operaci varlete z jiného důvodu než pro TGN, opět po jejich informovaném souhlasu.

Z odoperovaného varlete byl vždy spolupracujícím patologem odebrán vzorek nádoru a vzorek okolní nenádorové tkáně, jejich charakter byl potvrzen mikroskopickým vyšetřením. Následně z nich byly připravené řezy po 5 mikrometrech k extrakci DNA a RNA. Od pacientů byl dále odebrán vzorek periferní krve, který sloužil jako zdroj kontrolní normální DNA (germ-line kontrola).

Tabulka 2: Charakteristika TGN pacientů, zařazených do jednotlivých částí projektu

Charakteristika TGN pacientů	Prospektivní kohorta (čerstvě zmražené)	Retrospektivní kohorta (fixované v parafinových bločcích)
Celkem	105 pacientů / 114 vzorků	143 pacientů / 170 vzorků
seminomy	52 / 59	78 vzorků
neseminomy	49 / 51	76 vzorků
metastatické seminomy	-	1 vzorků
metastatické neseminomy	-	15 vzorků
stromální nádory	4 / 4	-
věk v době diagnózy[median-rozpětí]	33 (14 – 68) let	33 (18 – 65) let
Klinické stádium v době diagnózy:		
CS I	51	80
CS I S	22	19
CS II	10	26
CS III	8	27
neznámý	10	1
1-linie terapie:		
chemoterapie	58	120
radioterapie	10	27
sledování	7	1
neznámý	26	5
Klinický stav:		
sledování [median-rozpětí]	26 (0 – 75) měsíců	72 (1 – 185) měsíců
relapsy	5	13
žijí v CR	80	137
zemřeli na TGN	2	5
z jiné příčiny	1	1
ztraceni ze sledování	18	0
Kontroly		
celkem	77 pacientů / 100 vzorků	147 vzorků
okolí nádoru (+/- GCNIS)	34 / 35	48
semenný provazec + epidydimis	-	99
jiné diagnózy	41 / 61	-
jiné nádory	2 / 4	-

GCNIS (Germ Cell Neoplasia in Situ); Prospektivní kohorta – pacienti vyšetření na expresi a mutaci genu *WT1* a mutaci v genu *BRAF*; Retrospektivní kohorta – pacienti vyšetření na expresi proteinu WT1 a p53 a mutaci v genu *BRAF*

Tabulka 3: Charakteristika pacientů vyšetřených pomocí masivně paralelního sekvenování

ID	Věk v době diagnózy	Histologie	CS	Terapie	R	FUP [měsíce]	Přežívání	Vývoj nádorů při poslední kontrole
WES								
pt1	23	NS	IS	CHT		37	ANO	DF
pt2	29	NS	III	CHT		4	NE	PD
pt3	38	NS	III	CHT+surg(RP LAE)	ANO	42	ANO	DF
pt4	28	NS	IS	CHT		44	ANO	DF
Amplikonové sekvenování								
A1	46	S	IS	CHT		83	ANO	DF
A2	31	NS	IS	CHT		57	ANO	DF
A3	27	S	I	CHT		96	ANO	DF
A4	31	S	I	RT		60	ANO	DF
A5	23	NS	IS	CHT		81	ANO	DF
A6	22	S	IS	CHT		51	ANO	DF
A7	31	S	II	CHT		138	ANO	DF
A8	42	NS	I	CHT		106	ANO	DF
A9	26	NS	I	CHT		52	ANO	DF
A10	44	NS	I	CHT		72	ANO	DF
A11	31	S	IS	RT		89	ANO	DF
A12	37	NS	I	CHT		46	ANO	DF
A13	37	S	I	RT		41	ANO	DF
A14	35	NS	III	CHT		57	ANO	DF
A15	43	S	II	CHT		28	ANO	DF
A16	29	S	I	CHT		37	ANO	DF
A17	23	NS	II	CHT		72	ANO	DF
A18	29	S	I	RT		39	ANO	DF
A19	48	NS	IS	CHT		92	ANO	DF
A20	58	S	I	CHT		16	ANO	DF
A21	30	NS	IS	CHT		19	ANO	DF
A22	34	S	II	CHT		20	ANO	DF
A23	65	NS	III	CHT	ANO	11	NE	PD
A24	33	S	I	RT		23	ANO	DF
A25	40	NS	I	CHT		27	ANO	DF
A26	21	NS	IS	CHT		23	ANO	DF
A27	37	S	I	CHT		24	ANO	DF

WES – pacienti analyzovaní pomocí celoexomového sekvenování, Amplikonové sekvenování – pacienti analyzovaní pomocí amplikonového sekvenování, NS – neseminomy, S - seminomy, CS – klinické stadium nádoru, R – relaps, CHT – chemoterapie, RT – radioterapie, surg (RP LAE) – operace (retroperitoneální lymfadenektomie), FUP - follow-up, DF – disease-free (bez známek nemoci), PD – progredující onemocnění;

3.2. Testikulární germinální buněčné linie

Pro vypracování této práce bylo prvotně plánováno použití tří testikulárních buněčných linií - dvou neseminomových (NCCIT a Tera-2) a jedné seminomové (T-Cam) (Tab. 4).

Linie NCCIT a Tera-2 byly zakoupeny z banky buněčných linií ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, USA). Bohužel žádná seminomová testikulární buněčná linie není k dispozici ke koupi v bankách buněčných kultur. Z tohoto důvodu byla linie T-Cam získána darem od profesora L. H. J. Looijenga. (Tab. 4). Následné pokusy s buněčnou linií T-Cam vedly k jejímu vyloučení z dalších analýz a statistických závěrů s ohledem na její nejistý původ a nekonzistentní charakteristiky.

Všechny buněčné linie byly pěstovány v kultivačním médiu RPMI1640 s 10% inaktivovaným fetálním sérem (FBS) a antibiotiky (vše Life Technologies, Carlsbad, USA). Všechny tři buněčné linie byly pěstovány v kultivatorech s 5% CO₂ (HERAcell 150 CO₂ (ThermoScientific, Wilmington, USA).

Tabulka 4. Přehled použitých buněčných linií

Buněčná linie	Zdroj	Typ
NCCIT	ATCC CRL-2073	neseminom
Tera-2	ATCC HTB-106	neseminom
T-Cam	dar od Prof. Leendert Looijenga, Dept. of Pathology, Erasmus MC-University Medical Center Rotterdam, Nizozemsko	seminom

3.3. Pěstování testikulárních buněčných linií s cisplatinou

Všechny tři buněčné linie byly pěstovány za podmínek zvyšující se koncentrace cisplatinu (CDDP). Počáteční koncentrace cisplatinu byla 0,1 µM. Tato koncentrace byla udržována po dobu dosažení 80% letality v buněčné kultuře. Po dosažení těchto hodnot letality byly buňky pěstovány v čistém médiu bez obsahu cisplatinu po dobu čtyř pasáží. Postupně docházelo ke zvyšování koncentrace cisplatinu v médiu až na hodnotu 2 µM pro buněčné linie NCCIT a T-Cam, u buněčné linie Tera-2 bylo dosaženo nejvyšší tolerované koncentrace cisplatinu 0,1 µM, vyšší koncentrace vedly vždy k úplnému vymření buněk.

3.4. Stanovení růstu buněk v kultuře

Pro účely hodnocení rozdílů v buněčném růstu v závislosti na získané rezistenci na cisplatinu bylo nasazeno stejné množství buněk ze všech hodnocených kultur. Tento počet buněk byl dále sledován po dobu 13 dnů (4 pasáží). Pokus byl prováděn v triplicátech pro každou buněčnou linii v nepřítomnosti cispatiny. Výsledky byly statisticky zhodnoceny.

3.5. Stanovení citlivosti na cisplatinu

Ke stanovení hodnoty IC_{50} pro cisplatinu bylo použito testu hodnotícího proliferaci buněk analýzou jejich metabolické aktivity. Jednalo se o v takovýchto případech obvykle používaný MTS test (Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA). Tento test byl prováděn vždy v triplicátech nebo šestiplikátech při různých koncentracích cisplatinu. Tato koncentrace byla přizpůsobována aktuálnímu stavu buněčných kultur s ohledem na jejich stoupající rezistenci. V průběhu vypracování této práce bylo nashromážděno vícero výsledků MTS testů, přičemž po ustálení rezistence na cisplatinu byla též provedena opakovaná měření sloužící ke stanovení finální rezistence. Tyto konečné výsledky byly statisticky zpracovány a byly podkladem pro vzniklé grafy hodnotící buněčnou rezistenci.

3.6. Analýza buněčného cyklu pomocí barvení nukleotidovým analogem EdU

Buněčné kultury byly pěstovány po dobu 1,5 hodiny v přítomnosti 10 μ M koncentrace nukleotidového analogu EdU (Click-iT® Plus EdU Imaging Kits, ThermoFisher Scientific). Poté byly buňky ošetřeny trypsinem, promyty PBS (phosphate buffered saline), po centrifugaci fixovány 10% formaldehydem po dobu 10 minut a permeabilizovány 0,1% Tritonem po dobu 15 minut. Následovalo promytí 4% FBS (fetal bovine serum) v PBS, centrifugace a značení flourochromem Alexa fluor 647 po dobu 30 minut ve tmě. Proliferace byla měřena na průtokovém cytometru LSR II instrument (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.7. Analýza buněčného cyklu pomocí barvení Hoechst 33342 a Pyronin Y

Buňky byly ošetřeny trypsinem a po centrifugaci resuspendovány v PBS (pH 4.8). Následovala inkubace při pokojové teplotě ve tmě po dobu 20 minut. Poté došlo k dalšímu promytí PBS a po centrifugaci byly buňky promyty 1 ml barvicího roztoku PBS s 1.5 μ g/ml pyronin Y a 2 μ g/ml Hoechst 33342. Následovala centrifugace a inkubace s 200 μ l stejného barvicího roztoku po dobu 10 minut na ledu. Analýza buněčného cyklu byla provedena na

přístroji LSR II instrument (BD Biosciences). Všechny centrifugační kroky týkající se cytomerních i ostatních pokusů s buněčnými liniemi probíhaly při následujících podmínkách: 1000 rpm, 5 min.

3.8. Analýza apoptózy

Apoptóza byla hodnocena jak za podmínek přítomnosti cisplatinu o koncentraci 10 μM po dobu 72 hodin, tak i za stejný časový úsek bez přítomnosti cisplatinu. Buňky byly vždy následně ošetřeny trypsinem a promyty PBS. Následovalo barvení annexinem V-Dy647 (RCANXD-T100, Exbio, Vestec, Česká republika) a propidium jodidem (PI, 130-093-233, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Podíl apoptotických a nekrotických buněk byl hodnocen na přístroji LSR II instrument (BD Biosciences).

3.9. Izolace nukleových kyselin

Izolace RNA ze vzorků čerstvě zamražené tkáně byla prováděna pomocí RNeasyMini kitu (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. Izolace RNA ze vzorků tkáně fixované v parafinových bločcích byla prováděna pomocí High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Basel, Švýcarsko) dle návodu výrobce. Izolace DNA ze vzorků čerstvě mražené tkáně byla prováděna pomocí DNA blood mini kitu (Qiagen GmbH) dle návodu výrobce. Izolace DNA ze vzorků tkáně fixované v parafinových bločcích FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) byla prováděna pomocí RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (ThermoFisher Scientific) dle návodu výrobce. Kvalita a množství nukleových kyselin bylo kontrolováno spektrofotometricky, případně za použití kapilární elektroforézy Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

3.10. Reverzní transkripce

Syntéza cDNA byla provedena pomocí kitu iScript (BioRad, Hercules, USA) z 1 μg RNA. Metoda je založena na využití modifikovaného enzymu reverzní transkriptázy z viru MMLV. Tento enzym syntetizuje komplementární DNA k templátovému řetězci RNA za použití oligo(dT) a náhodných hexamerových primerů.

3.11. Kvantitativní PCR

Ke stanovení exprese genu *WT1* v nádorových a kontrolních vzorcích byla použita metoda kvantitativní PCR - qPCR (real-time quantitative polymerase chain reaction). Kontrolním genem byl gen pro kinázu *ABL*, jehož exprese se považuje za stabilní a řadí se do

skupiny tzv. housekeeping genů (Boublikova *et al.*, 2006). Reakční směs obsahovala: forward a reverse primery pro gen *WT1*, respektive pro gen *ABL*, každý o koncentraci 300 nM, fluorescenční detekční sondu pro daný gen s fluorochromem 6FAM (6-carboxyfluorescein) a zhasěčem TAMRA (tetramethylrhodamine) o koncentraci 200 nM, Universal Master Mix (Life Technologies), sterilní vodu a cDNA (10 % celkového objemu přeepsané RNA). Reakce probíhala na přístroji Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (LifeTechnologies) za podmínek viz Tab. 5.

Tabulka 5. Přehled použitých reakčních podmínek a primerů pro detekci celkového množství genu *WT1*.

Primery a sondy	Sekvence	Reakční koncentrace/ Množství	Reakční podmínky
WT1_Fwd (Ex6) 15 µM	TAC ACA CGC ACG GTG TCT TCA	300 nM 0,5 µl	50°C 2 min 95°C 10 min
WT1_Rev (Ex7) 15 µM	CTC AGA TGC CGA CCA TAC AAG	300 nM 0,5 µl	
WT1_sonda (Ex6/7) 5 µM	6FAM-AGG CAT TCA GGA TGT GCG ACG TGT G-TAMRA	200 nM 1 µl	95°C 15s 60°C 1min (50 cyklů) 37°C 5min
Další reakční složky	-	Množství	
cDNA	-	5 µl	
2x TaqMan Universal Master Mix	-	12,5 µl	
H ₂ O	-	doplněno do objemu 25 µl	

Reakce stanovující expresi genu *WT1* byly provedeny vždy v triplikátech, reakce stanovující expresi kontrolního genu *ABL* byly provedeny v duplikátech. Počet kopií obou genů byl stanoven za pomoci standardní řady kalibrátorů, k čemuž byly použity roztoky plazmidů daných genů. Pro *WT1* to byl námi vyrobený plazmid se zaklonovanou částí genu *WT1* (Boublikova *et al.*, 2006). Pro gen *ABL* byla použita komerčně dostupná řada kalibrátorů (Qiagen GmbH). Výsledný počet kopií *WT1* byl normalizován ke kontrolnímu genu *ABL* (*WT1* NCN - normalised copy number) dle následujícího výpočtu:

$$WT1(NCN) = (\text{kopie genu } WT1 \times 10\,000) / (\text{kopie genu } ABL)$$

3.12. Detekce exprese izoforem genu *WT1*

Expres izoforem genu *WT1* byla stanovena pomocí metody kvantitativní PCR – qPCR. K absolutní kvantifikaci byly použity námi připravené kalibrátorové plazmidy. Čtyři hlavní izoformy genu *WT1* se liší přítomností, či absencí exonu 5; dalším rozdílem je přítomnost, či nepřítomnost fragmentu KTS. Všechny izoformy *WT1* byly detekovány zvlášť. Detekované izoformy *WT1* tedy byly následující: A [EX5-/KTS-], B [EX5+/KTS-], C [EX5-/KTS+] a D [EX5+/KTS+]. Reakční systém pro detekci izoforem *WT1* genu byl vyvinut v naší laboratoři a je detailně popsán viz. Tab 6. a 7., dále též publikace (Kramarzova *et al.*, 2012).

Tabulka 6. Přehled použitých reakčních podmínek pro detekci izoforem genu *WT1*

Primery a sondy	Reakční koncentrace/ Množství	Reakční podmínky
WT1_Fwd 15 µM	600 nM 1 µl	50°C 2 min
WT1_Rev 15 µM	600 nM 1 µl	95°C 10 min
sonda 5 µM	200 nM 1 µl	10 cyklů postupně se snižující teploty (touchdown) 95°C 15s 67-62,5°C 1min 40 cyklů 95°C 15s 62°C 1min 37°C 5min
Další reakční složky	Množství	
cDNA	10 % objemu RT reakce	
dNTP 10 mM	800 µM 2 µl	
MgCl ₂	2 mM 2 µl	
PCR pufr 10x	2,5 µl	
Taq DNA polymeráza (5U/µl)	40nM 0,1 µl	
H ₂ O	doplněno do objemu 25 µl	

Tabulka 7. Přehled použitých primerů a sond pro detekci izoforem genu *WT1*.

Primery a sondy	Sekvence	Exon
EX5(-)_Fwd	GAG CCA CCT TAA AGG GCC A	přechod exonu 4 na exon 6
EX5(+)_Fwd	ATG GAC AGA AGG GCA GAG CA	exon 5
KTS(-)_Rev	GCT GAA GGG CTT TTC ACC TGT A	přechod exonu 10 na exon 9
KTS(+)_Rev	CTG AAG GGC TTT TCA CTT GTT TTA C	přechod exonu 10 na KTS
WT1_sonda	6FAM-AGG CAT TCA GGA TGT GCG ACG TGT G-TAMRA	přechod exonu 6 na exon 7

3.13. Detekce mutací v genu *WT1*

Detekce mutací v genu *WT1* byla provedena pomocí kvalitativního PCR s využitím specifických primerů navržených na úseky exonů 7 a 9. Následně bylo provedeno Sangerovo sekvenování daných vzorků. Mutace v celé délce genu *WT1* byly též hledány pomocí sekvenačních metod masivně paralelního sekvenování viz kapitoly 3.14 a 3.15. Reakční systém pro detekci mutací genu *WT1* je detailně popsán viz. Tab. 8 a 9, dále též v publikaci (Gaidzik *et al.*, 2009).

Tabulka 8. Přehled použitých primerů a sond pro detekci mutací v genu *WT1*.

Primery	Sekvence	Exon
EX7_Fwd	CTCCAGTGCTCACTCTCCCTC	exon 7
EX7_Rev	M13-CCTTAGCAGTGTGAGAGCCTG	
EX9_Fwd	M13-GTGAGGCAGATGCAGACATTG	exon 9
EX9_Rev	AGCCACGCACTATTCCTTCTC	

Tabulka 9. Přehled použitých podmínek pro detekci mutací v genu *WT1*.

Primery	Reakční koncentrace/ Množství	Reakční podmínky
Fwd 20 µM	10 nM 0,5 µl	95°C 10 min
Rev 20 µM	10 nM 0,5 µl	
Další reakční složky	Množství	40 cyklů
DNA	100 ng	
dNTP 10mM	4 µl	95°C 10s
MgCl ₂ 50mM	0,75 µl	57°C 30s
Platinum pufr 10x	2,5 µl	72°C 30s
Platinum Taq polymeráza	5U/µl 0,2 µl	72°C 7min
H ₂ O	doplněno do objemu 25 µl	

3.14. Detekce mutace v genu *BRAF*

Bodová mutace *BRAF* 1799T>A (V600E) byla detekována a kvantifikována pomocí komerčního kitu TaqMan Mutation Detection Assay (ThermoFisher Scientific). Mutace v celé délce genu *BRAF* byly též hledány pomocí sekvenačních metod masivně-paralelního sekvenování viz kapitoly 3.14 a 3.15.

3.15. Amplikonové masivně-paralelní sekvenování

Metodou amplikonového masivně-paralelního sekvenování bylo analyzováno 27 pacientů, jejichž nádorový materiál byl fixován v podobě parafinových bločků (FFPE). Pro toto sekvenování bylo použito 40 ng DNA extrahované z každého vzorku FFPE po zkontrolování její kvality a integrity. Jako kontroly k těmto vzorkům sloužily vzorky periferní krve, které vždy prošly stejným procesem zpracování i kontrolou kvality jako vzorky z nádorové tkáně. Po izolaci DNA byly připraveny knihovny za pomoci kitu Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel (ThermoFisher Scientific) dle instrukcí výrobce. Tento sekvenční panel umožňuje analýzu 400 genů (16 000 párů primerů ve 4 poolech / PCR reakcích na vzorek) podílejících se na vzniku nádorů. Kvantifikace množství a kvality DNA probíhala na platformách Qubit 2.0 Fluorometer/Qubit dsDNA BR Assay Kit a Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies). Sekvence probíhala na přístroji Ion Torrent pomocí sady Ion PI Sequencing 200 Kit v2 a čipu PI 318 (vše ThermoFisher Scientific). V tomto nastavení se základní délkou čtení 200 bazí může být k dispozici až celkem 80 milionů čtení a 10 Gb dat na 1 sekvenační běh. Všechny postupy byly provedeny podle pokynů výrobce a podrobné protokoly jsou k dispozici na webových stránkách výrobce.

3.16. Celoxomové masivně-paralelní sekvenování

Celoxomovým sekvenováním byly vyšetřeny 4 nádorové vzorky s příslušnými kontrolními vzorky germinální DNA (2 z periferní krve a 2 z buněk z okolí tumoru). Knihovny ze vzorků pacientů byly připraveny pomocí Nimblegen SeqCap EZ Human Exome Library v2.0 (Roche, Basel, Švýcarsko) počínaje 1 μ g gDNA a sekvenování probíhalo na přístroji HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA). Tyto vzorky byly sekvenované v Atlas Biolabs (Berlín, Německo).

Dále byly na celoxomové úrovni sekvenovány všechny buněčné linie. Sekvence těchto vzorků byla provedena v naší laboratoři. Knihovny byly připraveny pomocí kitu SureSelectXT Human All Exon V6+UTR (Agilent), dle instrukcí výrobce. Koncentrace použité DNA byla 50 ng. Vzorky byly sekvenovány na přístroji NextSeq 500 (Illumina) pomocí soupravy High Output Kit v2 (150 cyklů) (Illumina) podle pokynů výrobce. Byla použita metoda párového čtení ($n \geq 1,6 \times 10^8$ párovaných čtení) se středním skóre kvality (Phred) nad 30. Průměrně 92 % přečtení (tzv. readů) bylo mapováno do cílových úseků (minimálně 72 %) s průměrným pokrytím 50 x.

3.17. Transkriptomové masivně-paralelní sekvenování

Touto metodou byly analyzované všechny buněčné linie. Knihovny byly připraveny pomocí kitu SureSelectXT RNA Reagent Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) dle instrukcí výrobce. Sekvence byla provedena v naší laboratoři na přístroji NextSeq 500 (Illumina) pomocí soupravy High Output Kit v2 (150 cyklů) (Illumina) podle pokynů výrobce. Průměrné pokrytí bylo 121,44 (minimum 76,43) readů s mírou duplicity nižší než 60 %.

3.18. Imunohistochemické barvení proteinů WT1 a p53

Přítomnost proteinů WT1 a p53 byla detekována na tkáňových preparátech fixovaných v parafinových bločcích za použití imunohistochemického barvení následujícími protilátkami: myšší monoklonální protilátka proti proteinu p53 klon DO-7 (DAKO, Glostrup, Dánsko) a myšší monoklonální protilátka proti proteinu WT1 klon 6F-H2 (DAKO). Pro vizualizaci byla následně použita králičí sekundární protilátka a kit REAL EnVision – HRP, Rabbit/Mouse, DAB+ (DAKO). Hodnocení probíhalo na mikroskopu Olympus BX51; objektivy UPlanFLN 10x/0.30 (100x), 20x/0.50 (200x – použito při fotodokumentaci) a 40x/0.75 (400x) (Olympus, Tokyo, Japan). K fotodokumentaci byla použita kamera JVC KY-F1030 (JVC, Long Beach, CA, USA). Toto barvení daných proteinů bylo provedeno ve spolupracující laboratoři, která nám dodala výsledné materiály ke zhodnocení a korelaci s klinickými daty pacientů.

Skórovací systém pro vyhodnocování preparátů pro detekci proteinu p53:

- 0 negativní nebo pozitivita v <10 % buněk
- 1 10-29 % pozitivních buněk
- 2 30-49 % pozitivních buněk
- 3 50 a více % pozitivních buněk

3.19. Analýza a statistické zpracování dat

Výsledky z provedených experimentů byly statisticky hodnoceny pomocí programů Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA), Prism (Graph Pad, La Jolla, CA, USA) a programu R (Vienna, Rakousko). Data získaná Sangerovým sekvenováním byla vizualizována a hodnocena v programu Mutation Surveyor 4.0 (SoftGenetics, State College, USA). Význam a interpretace nalezených variant SNVs byly provedeny pomocí webových aplikací GeneCards (<https://www.genecards.org/>) a Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>).

Ke statistickému zpracování výsledků MTS testu byl použit statistický balíček k programu R (drc package) (Ritz et al., 2015).

Statistické analýzy exprese genu *WT1* a jeho izoforem, exprese proteinu WT1 a p53 a mutací genu *BRAF* byly provedeny za použití neparametrických statistických testů (Mann-Whitney nebo Kruskal-Wallis), dále pomocí Chi-square a Fisher's exact test.

Primární data vzniklá amplikonovým sekvenováním byla nejprve analyzována pomocí softwaru Torrent Suite (ThermoFisher Scientific) - souhrnné výsledky, srovnání s lidským referenčním genomem (hg19) (BWA) (Li and Durbin, 2010), kontrola kvality (QC), analýza pokrytí a vyvolání variant. Software Ion Reporter (ThermoFisher Scientific) a Ingenuity Software (Qiagen) byly použity pro anotaci variant, filtrování tzv. post-call variant a hodnocení funkčních a klinických dopadů. Varianty byly vizualizovány v Integrative Genomics Viewer (IGV) (Broad Institute, Cambridge, MA, USA) (Robinson *et al.*, 2011). Kromě toho byly primární i druhotné údaje QC (včetně pokrytí) podrobně přehodnoceny pomocí programu FastQC (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK) (*Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*) a Qualimap (Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany) (Okonechnikov, Conesa and García-Alcalde, 2016). Byly detekovány krátké varianty (jednoduché nukleotidové varianty - SNV, krátké inserce či delece) a variace počtu kopií (CNV, které jsou chápány jako varianty v počtech dlouhých delecí nebo amplifikací).

Pro jednu část projektu byly analyzovány SNVs ve vybraných genech *WT1*, *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *BRAF* a *KIT*. Všechny vyfiltrované varianty musely projít QC a splnit následující filtrační kritéria: varianty přítomné pouze ve vzorcích nádoru a nevyskytující se v párové kontrole; minimální počet readů variantní alely ≥ 5 ; frekvence variantní alely $\geq 0,1$; efekt variantní alely - missense (zařadí se jiná aminokyselina a může tak být změněna až znemožněna funkce genového produktu), nonsense/stop (vznik nového stop neboli terminačního kodonu), posun rámce a neznámý; klinický účinek - patogenní, pravděpodobně patogenní; a počet načtených alel v párové kontrole ≥ 5 .

Při další, tentokrát souhrnné analýze všech dat z amplikonového sekvenování byla použita následující filtrační kritéria: minimální frekvence readů variantní alely $\geq 0,2$ v nádorovém vzorku a $\leq 0,03$ v párové kontrolní DNA ze zárodečné linie, ostatní filtry stejné jako v předchozím případě.

Všechny varianty identifikované softwarovými nástroji byly manuálně zkontrolovány v IGV na jejich přítomnost ve vzorcích nádoru (odečty obou řetězců), nepřítomnost v kontrolních vzorcích, frekvence, kvalita a kontext sekvence (např. přítomnost homopolymerů) a vše, co nesplnilo tato kritéria a/nebo by mohlo být výsledkem technické chyby, bylo z dalších analýz vyloučeno. Potvrzené varianty byly nakonec opět porovnány s databází SNP

(dbSNP, Národní centrum pro biotechnologické informace, Bethesda, MD, USA) a katalogem somatických mutací pro nádory (COSMIC, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Velká Británie), aby bylo zjištěno, zda již byly popsány a jaký je jejich odhadovaný výskyt v populaci a role při vzniku nádoru. CNV byly vyhledávány pomocí algoritmu Hidden Markov Model s nízkou citlivostí a vyšší spolehlivostí ($\geq 10,0$).

Pro sekvenování WES byly dále hodnoceny pouze významné varianty, které vyhověly filtračním kritériím: počet kvalitních readů variantní alely ≥ 5 ; frekvence variantní alely v kontrolních vzorcích (zárodečná linie nebo cisplatina neexponované) $\leq 0,03$; frekvence variantní alely ve studovaných primárních nádorových vzorcích $\geq 0,30$ a v CDDP-exponovaných buněčných liniích $\geq 0,80$; synonymní varianty byly vyloučeny). Identifikované varianty byly potvrzeny jako jedinečné pro CDDP-exponované buňky kontrolou jejich nízké/žádné přítomnosti v CDDP-neexponované linii dlouhodobě pěstované v paralelní kultuře.

Nádorová mutační nálož (TMB) byla vypočtena jako počet filtrovaných (SNV) (≥ 5 , frekvence variant $\geq 0,05$, vyloučeny synonymní varianty), vztažených na délku pokrytých exonů.

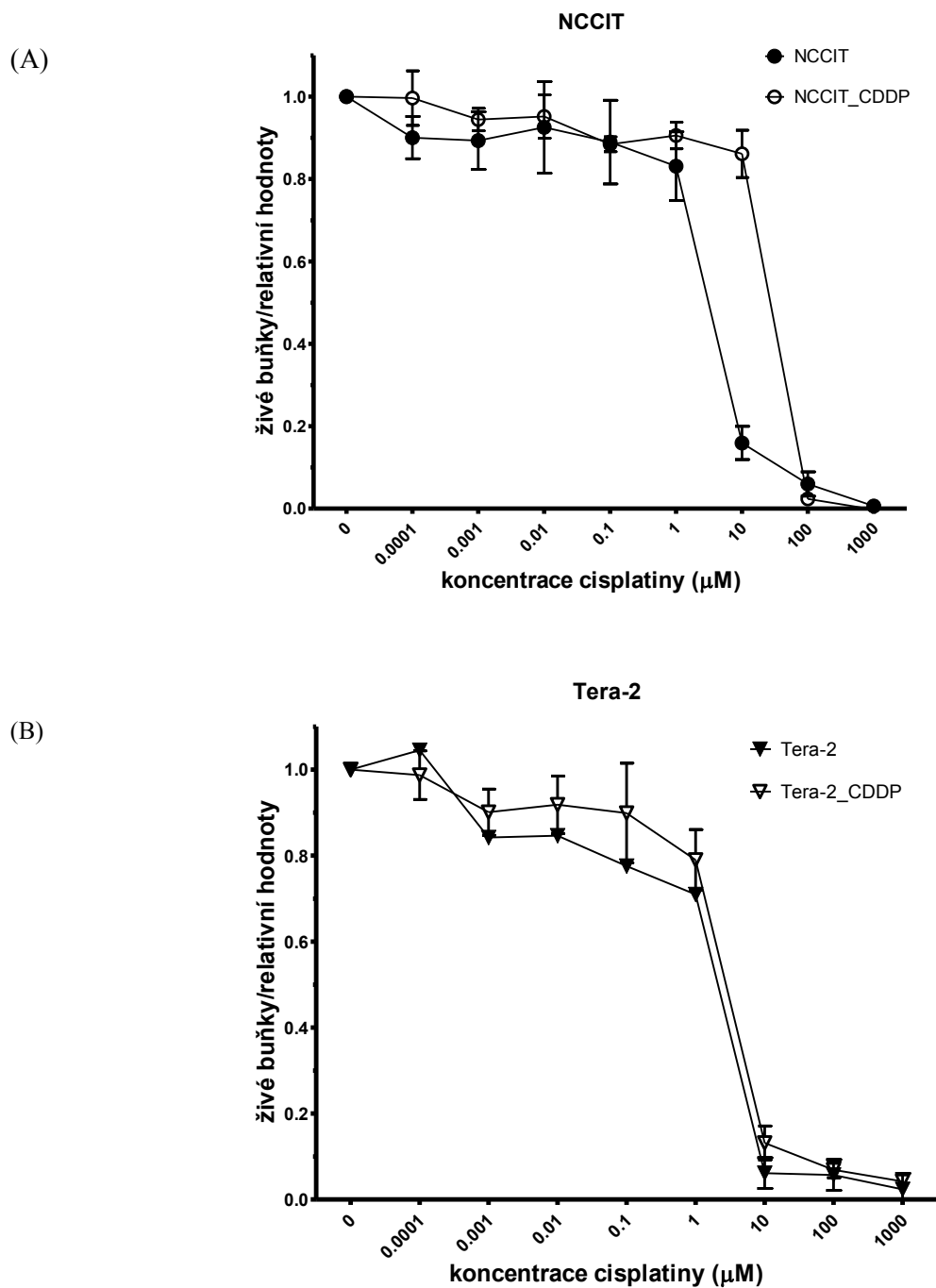
Varianty počtu kopií byly předpovězeny z dat WES pomocí soupravy CNV (Talevich *et al.*, 2016) s normalizací na sdružené kontrolní vzorky sekvenované na stejném přístroji pomocí stejných souprav pro přípravu knihovny. Pro všechny vzorky byly vypočteny predikované segmentové změny a pro další srovnání byly vybrány segmenty s predikovanou CN odlišnou od 2. Vybrané oblasti byly vyneseny do diagramů pro všechny vzorky.

4. Výsledky

4.1. Příprava testikulárních germinálních buněčných linií rezistentních na cisplatinu a analýza jejich vlastností

4.1.1. Rezistence testikulárních germinálních buněčných linií na cisplatinu

Po 20 měsících kultivace s intermitentní expozicí cisplatině se u dvou námi pěstovaných buněčných linií (CDDP-exponované) podařilo dosáhnout snížení citlivosti na cisplatinu, která dosahovala desetinásobku hodnoty IC_{50} dané původní linie (CDDP-naivní). Jednalo se o linie NCCIT a T-Cam. U třetí z pěstovaných testikulárních germinálních linií se během kultivačního období 15 měsíců nepodařilo vyvinout snížení citlivosti na toto cytostatikum větší než 1,5 násobek hodnoty IC_{50} změřené u původních CDDP-naivních buněk. Všechny naše další pokusy o zvýšení koncentrace používaného cytostatika měly na tuto buněčnou linii letální efekt (Obr. 5 a Tab. 10). Pro další pokusy v rámci této práce byly vyrobeny alikvoty buněk obou typů (CDDP-naivní a CDDP-exponované) pro všechny buněčné linie (NCCIT, Tera-2 a T-Cam). Alikvoty byly dále používány pro další pokusy za podmínek bez přítomnosti cisplatinu (není-li pro daný pokus uvedeno jinak), kdy citlivost na cisplatinu byla pravidelně ověřována. Buněčná linie T-Cam byla v procesu studia vyřazena z dalších závěrů a analýz, jelikož během ověřování identity a stanovování dalších vlastností buněčných kolonií se nepotvrdila její identita (viz Metody).



Obrázek 5: Konečná citlivost testikulárních buněčných linií na cisplatinu měřená MTS testem po 72 hodinách kultivace v přítomnosti cisplatinu: (A) CDDP-naivní (NCCIT) a CDDP-exponované (NCCIT_CDDP) buněčné linie; (B) CDDP-naivní (Tera-2) a CDDP-exponované (Tera-2_CDDP) buněčné linie. Zobrazená data pocházejí ze 4 nezávislých experimentů pro každou buněčnou linii, každý z experimentů obsahuje triplikáty nebo šestiplikáty

Tabulka 10. Přehled hodnot IC_{50} pro CDDP-naivní a CDDP-exponované buněčné linie NCCIT a Tera-2. (odhadovaná hodnota IC_{50} a směrodatná odchylka je vypočtena ze 4 nezávislých experimentů pro každou buněčnou linii, každý z experimentů obsahuje triplikáty nebo šestitriplicáty). Statistická signifikance výsledků vyplývá z nepřekrývajících se intervalů nejnižších a nejvyšších odhadovaných hodnot IC_{50} pro danou buněčnou linii

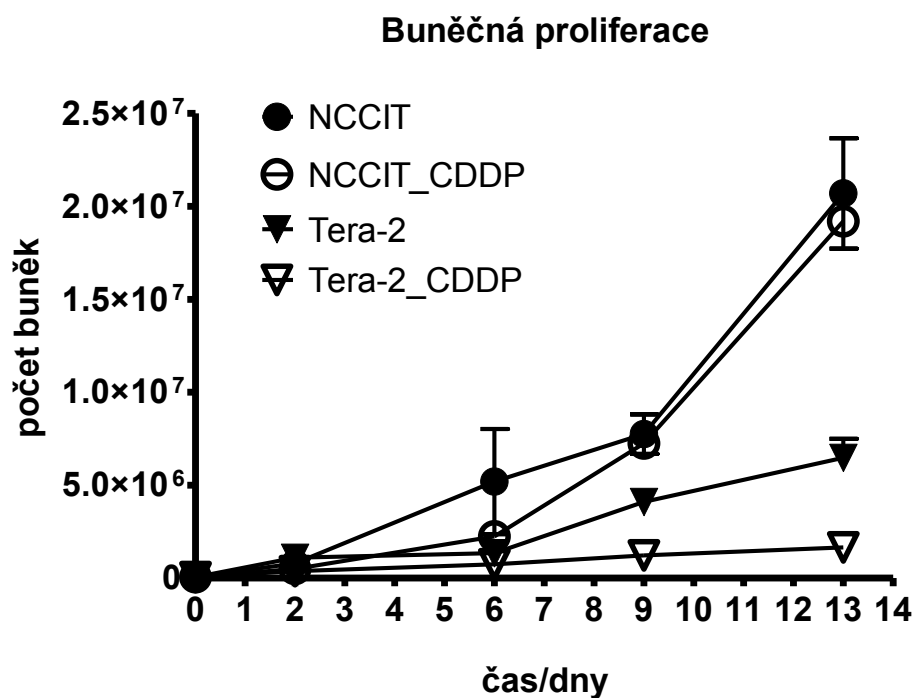
Buněčná linie	odhadovaná IC_{50}	směrodatná odchylka	nejnižší odhadovaná IC_{50}	nejvyšší odhadovaná IC_{50}
NCCIT	3,2	0,7	1,7	4,7
NCCIT_CDDP	31,4	9,7	11,7	51,1
Tera-2	2,2	0,5	1,2	3,1
Tera-2_CDDP	3	0,6	1,9	4,2

4.1.2. Analýza buněčného cyklu, proliferace a apoptózy u CDDP-naivních a CDDP-exponovaných buněčných linií

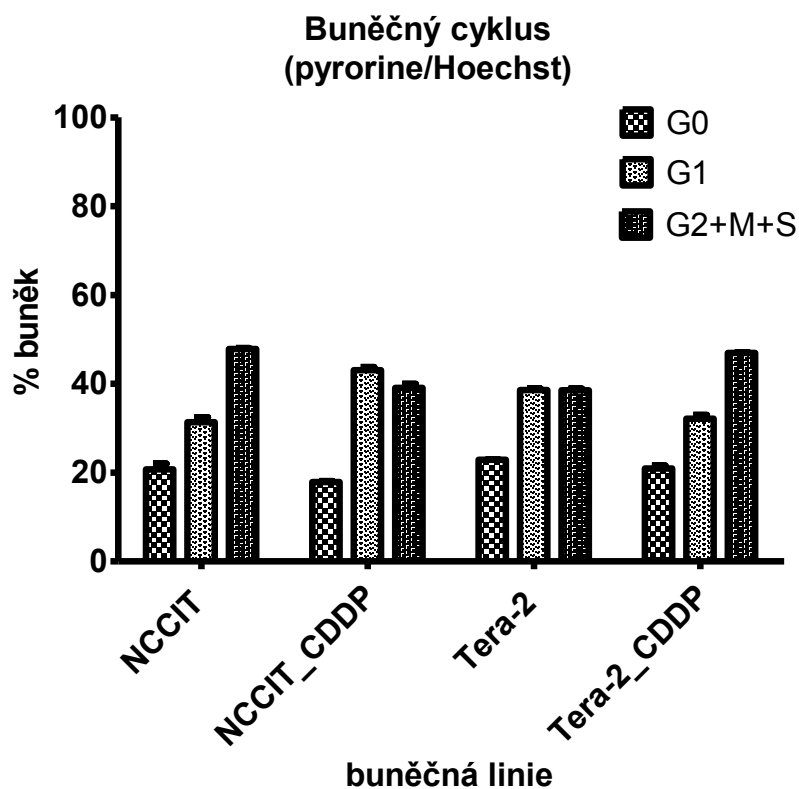
Za účelem studování a srovnání vlastností původních CDDP-naivních a dlouhodobě CDDP-exponovaných buněčných linií jsme v rámci tohoto experimentu při každé buněčné pasáži po dobu 14 dnů vždy stanovili počet živých buněk. Z takto získaných dat se ukázalo, že proliferace CDDP-exponovaných buněk byla vždy pomalejší než u původních CDDP-naivních linií. Buňky linií Tera-2 (CDDP-naivní i exponované) proliferovaly vždy pomaleji než buňky linie NCCIT (Obr. 6).

Za účelem dalšího studia vlastností námi získaných buněčných linií jsme provedli cytometrická měření po předchozím barvení pyroninem Y a Hoechst33342 (Obr. 7) a EdU (nukleotidový analog; Obr. 8).

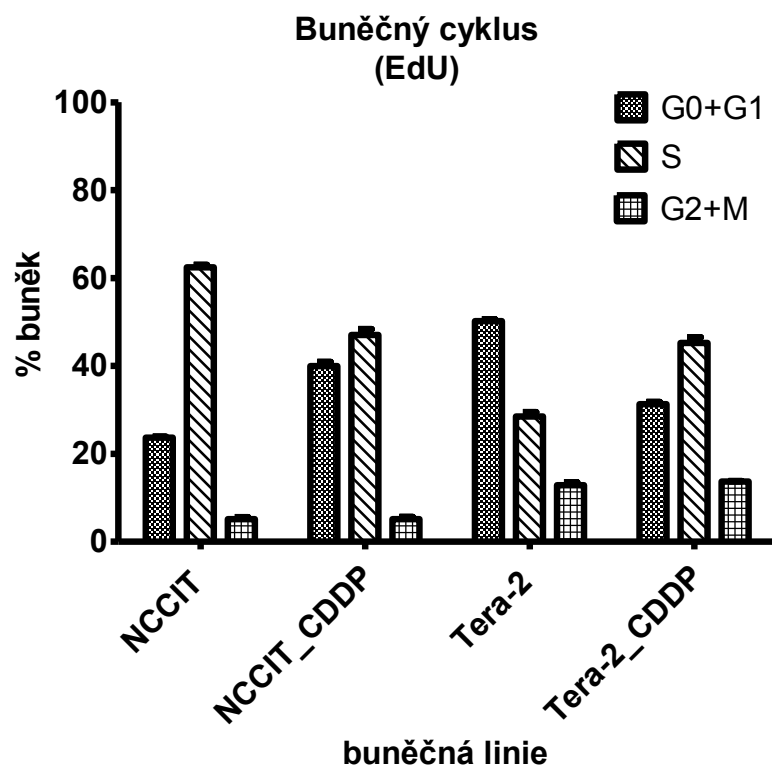
Z takto provedených pokusů jsme u linie NCCIT pozorovali, že více CDDP-exponovaných buněk zůstává v G1 fázi buněčného cyklu ($p = 0,05$) a zároveň méně buněk se nachází v S fázi buněčného cyklu ($p = 0,01$) v porovnání s CDDP-naivním protějškem těchto buněk. Zároveň měly tyto buňky velice dobrou viabilitu a i po jejich kultivaci s cisplatinou po dobu 72 hodin se u CDDP-exponovaných buněk neprojevovaly známky apoptózy ($p = 0,05$). U CDDP-naivních klonů se situace významně lišila a jejich viabilita po vystavení cytostatiku výrazně klesla. U druhé buněčné linie Tera-2 byla pozorovaná podobná avšak méně výrazná odezva buněk na cytostatikum. Tyto výsledky korelují s výsledky MTS testu provedeného na stejných buněčných populacích (Obr. 5 a 9).



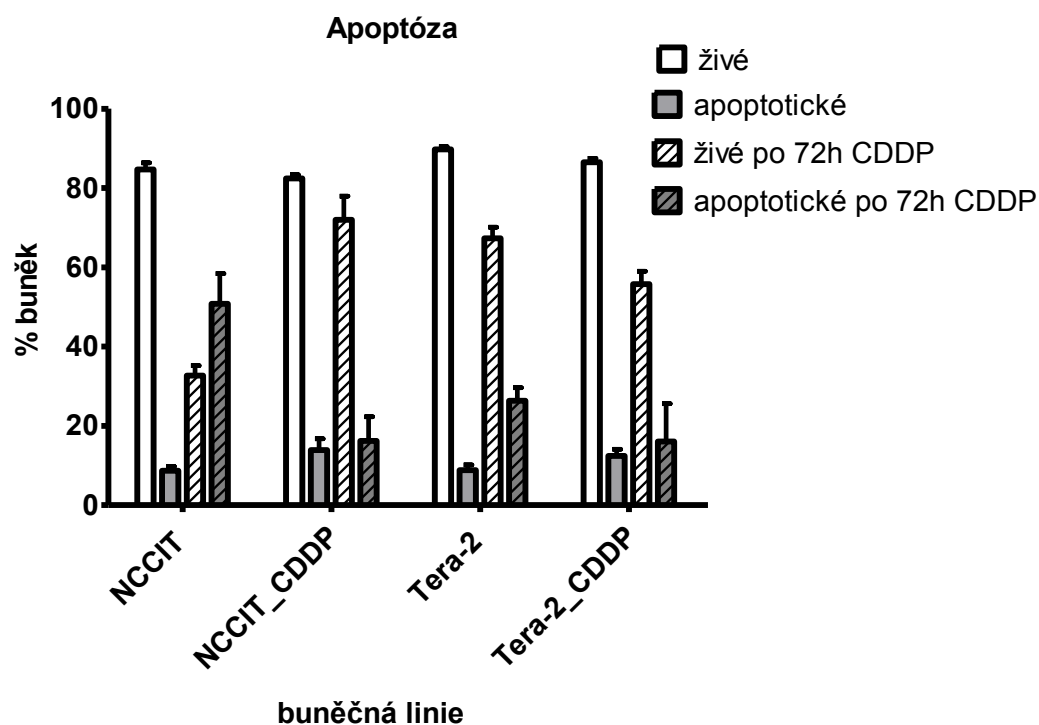
Obrázek 6: Buněčná proliferace během 14 denního kultivačního experimentu vyjádřená jako absolutní počet všech živých buněk.



Obrázek 7: Buněčný cyklus po cytometrickém měření a barvení pyroninem Y a Hoechst33342.



Obrázek 8: Buněčný cyklus po cytometrickém měření a předchozí buněčnou kultivací s nukleotidovým analogem EdU.



Obrázek 9: Analýza apoptózy po 72 hodinové expozici cisplatině a bez cisplatině a následné cytometrickém měření.

4.1.3. Analýza buněčných linií celoexomovým sekvenováním

V CDDP-exponovaných buňkách NCCIT (NCCIT_CDDP) jsme obecně pozorovali nárůst získaných variant. Bylo zjištěno 21 mutací typu missense nebo posunu čtecího rámce (frameshift), přičemž u CDDP-exponovaných buněk Tera-2 (Tera-2-CDDP) bylo ve srovnání s původní linií zajištěna pouze jedna taková mutace v genu *OPNILW* a to v 91 % sekvenačních přečteních. Mutace nově detekované u NCCIT_CDDP buněk se nacházely v genech hrajících roli v mnoha důležitých buněčných procesech jako například v mechanismech podílejících se na opravě poškozené DNA (gen *BCOR*) či v remodelaci chromatinu (geny *BRWD3* a *ATR*X), dále také v signálních (geny *MAP3K4* a *COMP*) a metabolických (geny *SLC22A2*, *HPSE*) drahách. Další z aberací zasahovala do dráhy podílející se na epiteliální-mesenchymální rovnováze (gen *KDR*). Zajímavým zjištěním byl nález tří různých missense mutací v genu *ATR*X získaných během snižování citlivosti na cisplatinu. Dvě z nich byly přítomny ve 100 % sekvenačních přečteních a třetí byla přítomna v 95 % z přečtení (Tab. 11).

Tabulka 11. Varianty detekované celoexomovým sekvenováním u CDDP-exponovaných a nepřítomné u CDDP-naivních buněčných linií.

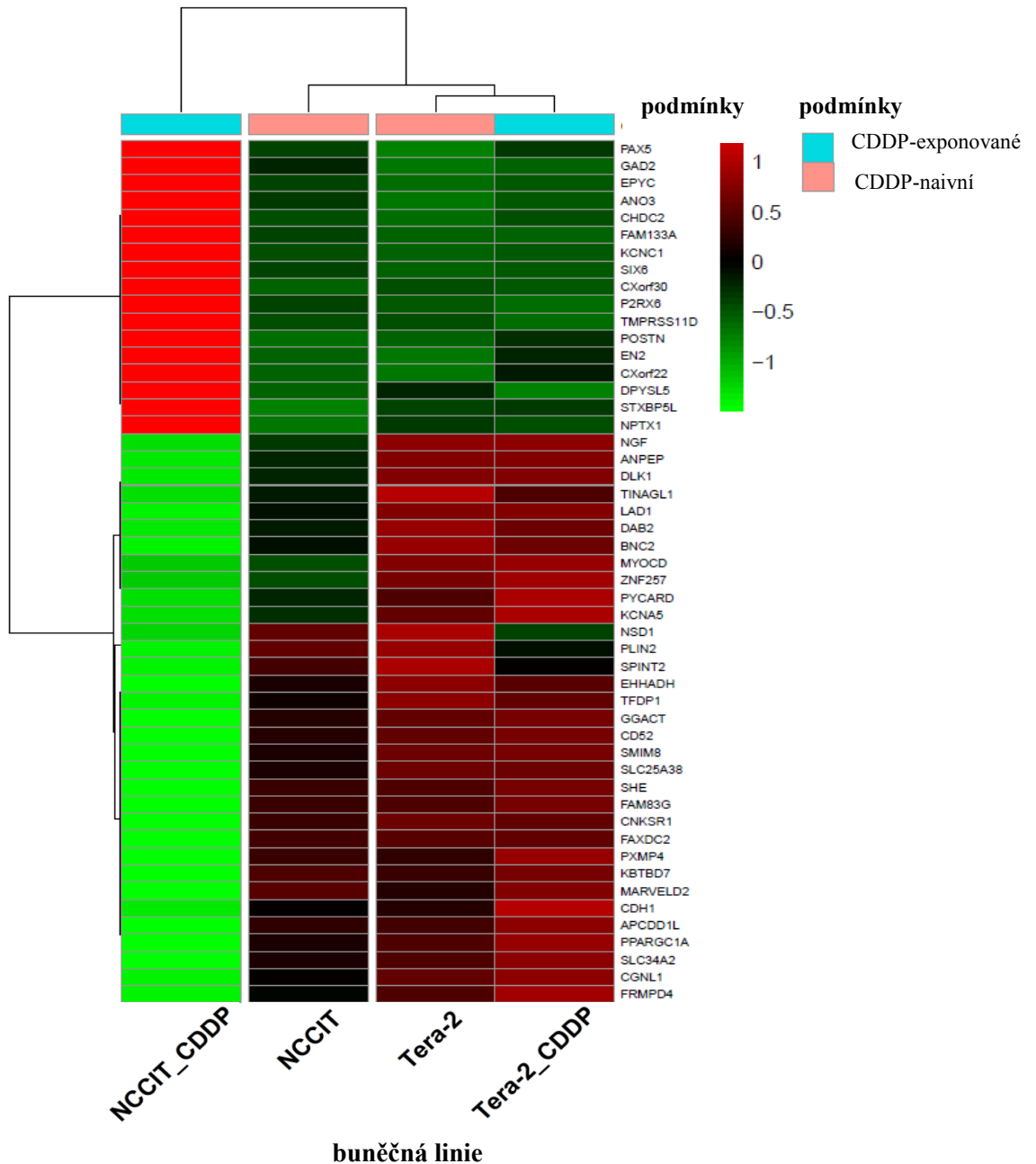
Chr	Pozice	ref	var	frekv var	gen	typ var	funkce
NCCIT_CDDP							
chr13	114307689	G	T	94 %	<i>ATP4B</i>	intron	P-typ kation-transportní ATPáza
chrX	76777763	G	T	95 %	<i>ATRX</i>	missense	chromatin remodelující enzym
chrX	76938527	C	A	100 %	<i>ATRX</i>	missense	chromatin remodelující enzym
chrX	76938528	C	A	100 %	<i>ATRX</i>	missense	chromatin remodelující enzym
chrX	39933413	C	A	89 %	<i>BCOR</i>	missense	transkripční korepresor
chrX	79980448	C	T	100 %	<i>BRWD3</i>	missense	histon vázající faktor
chr19	18899229	T	A	84 %	<i>COMP</i>	missense	protein extracelulární matrix
chr4	101344524	AG	A	91 %	<i>EMCN</i>	frameshift	mucinu podobný sialoglykoprotein
chr11	124794933	CG	C	81 %	<i>HEPACAM</i>	frameshift	molekula podílející se na buněčné adhezi
chr4	84240519	C	A	94 %	<i>HPSE</i>	missense	remodelátor extracelulární matrix
chr4	55984870	T	A	85 %	<i>KDR</i>	missense	receptor tyrosine kinázy
chr6	161455415	A	G	93 %	<i>MAP3K4</i>	missense	MAPK kináza
chr4	170384486	C	CA	95 %	<i>NEK1</i>	frameshift	serin/threonin kináza
chrX	101092554	G	T	88 %	<i>NXF5</i>	missense	exportní faktor jaderné RNA
chrX	38146319	C	T	98 %	<i>RPGR</i>	missense	guanin nukleotid výměnný faktor
chr19	46299131	T	G	81 %	<i>RSPH6A</i>	missense	neznámá funkce ve spermatických b.
chr4	83788367	T	A	88 %	<i>SEC31A</i>	missense	protein transportér
chr6	160679609	G	T	95 %	<i>SLC22A2</i>	missense	transportér kationtů
chrX	69772065	C	A	92 %	<i>TEX11</i>	missense	regulátor rekombinace
chr4	6302537	G	C	98 %	<i>WFS1</i>	missense	transporter kationtů
chr17	6673969	G	T	93 %	<i>XAF1</i>	missense	regulátor apoptózy
chr7	50097636	G	T	83 %	<i>ZPBP</i>	missense	zona pellucida vázací protein
Tera-2_CDDP							
chrX	153418437	C	A	91 %	<i>OPNILW</i>	missense	fotopigment

chr: chromozom, poz: pozice, ref: reference, var: varianta, frekv var.: frekvence varianty, var typ: typ varianty

4.1.4. Analýza buněčných linií na úrovni transkriptomu

U CDDP-naivních versus CDDP-exponovaných buněčných linií bylo vybráno 50 genů s nejvíce se lišící expresí pomocí metody unsupervised hierarchical clustering. Takto bylo nalezeno několik transkripčních faktorů souvisejících se vznikem nádorů, jako jsou např.

PAX5, *DAB2*, *SPINT2*, *TFDP1*. Dále se výrazně lišila i exprese histon methyltransferázy *NSD1*. Rozdílná exprese byla též detekována u genů regulujících buněčnou proliferaci (*DLK1*), buněčnou signalizaci (*CNKSRI*, *CNFSRI*, *APCDD1*, *EPYC*), metabolismus (*GAD2*, *ANPAP*, *PPARGC1A*), buněčný pohyb a adhezi (*CDHI*, *POSTN*). Rozdíly v expresi byly zjištěny i u genu *PYCARD* hrajícího významnou roli v procesu apoptózy a vzniku zánětlivé reakce. Detekovali jsme rozdíly v expresi i u dvou tzv. homeoboxových genů *SIX6* a *EN2* (Obr. 10).



Obrázek 10: Hierarchické rozdělení 50 nejrozdílněji exprimovaných genů u CDDP-naivních a CDDP-exponovaných buněčných linií.

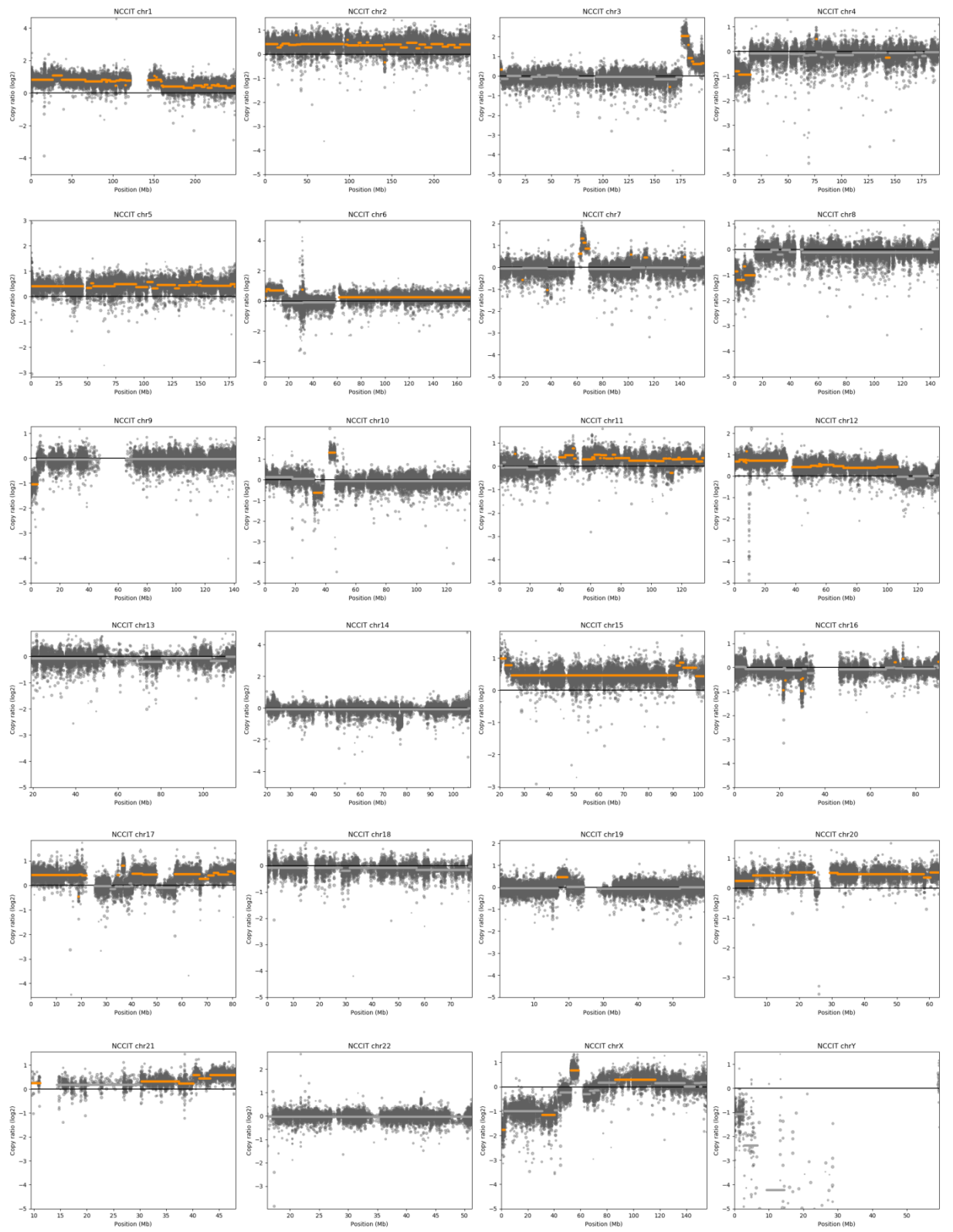
V průběhu hodnocení dat vzniklých transkriptomovým sekvenováním byla provedena analýza fúzních transkriptů genů. Tímto způsobem byly u NCCIT_CDDP i kontrolních NCCIT buněk nalezeny dva fúzní transkripty a to *SBF2/RNF141* a *EML4/MTA3*, které vznikly delecí a tandemovou duplikací. Existence těchto fúzí byla následně ověřena i Sangerovým sekvenováním. V případě buněčné linie Tera-2 byly nalezeny tři fúzní transkripty, a to opět jak u CDDP-exponovaných, tak i CDDP-naivních buněk. Dva z nich (*SPG7/CDH15* a *ZNHIT6/COL24A*) vznikly v důsledku tandemové duplikace v kódující sekvenci genu, zatímco v případě třetí fúze (*ZNF160/ZNF415*) byl kódující úsek genu translokován do 5' nekódující části jiného genu (Tab. 12).

Tabulka 12: Fúzní geny detekované u buněčných linií NCCIT a Tera-2, přítomné u obou populací CDDP-exponovaných, tak i CDDP-naivních buněk.

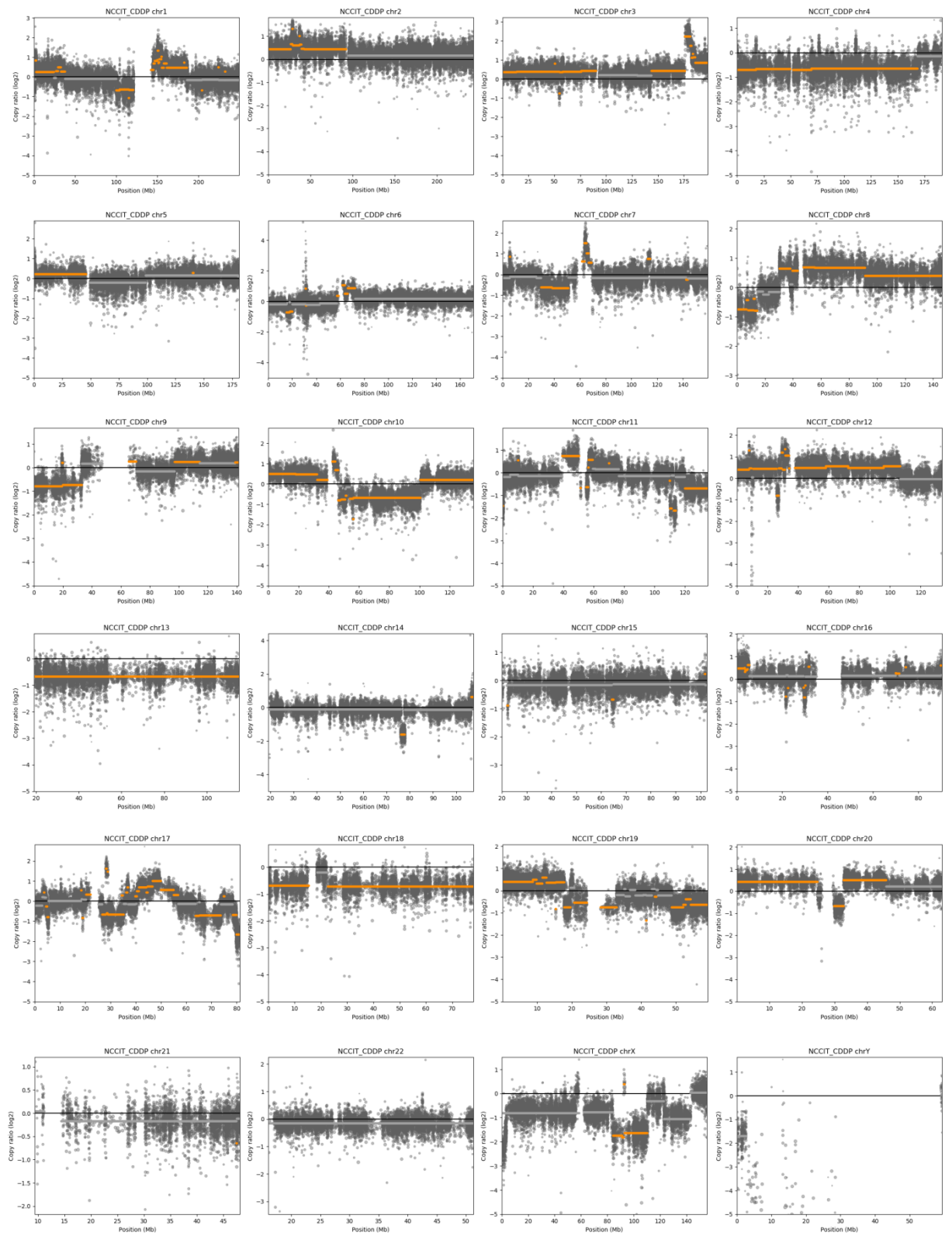
Buněčná linie	Gen 1	Gen2	Pozice 1	Pozice 2	Druh fúze
NCCIT	<i>SBF2</i>	<i>RNF141</i>	chr2(42472827)	chr2(42836598)	delece bez posunu čtecího rámce (in-frame)
	<i>EML4</i>	<i>MTA3</i>	chr11(10215449)	chr11(10546920)	amplifikace (tandemová duplikace)
Tera-2	<i>SPG7</i>	<i>CDH15</i>	chr16 (89614520)	chr16 (89251580)	amplifikace (tandemová duplikace)
	<i>ZNHIT6</i>	<i>COL24A</i>	chr1 (86167839)	chr1 (86315088)	amplifikace (tandemová duplikace)
	<i>ZNF160</i>	<i>ZNF415</i>	chr19 (53606517)	chr19 (53613160)	amplifikace (tandemová duplikace)

4.1.5. Analýza změn v počtech genových kopií (CNV) u testikulárních germinálních buněčných linií

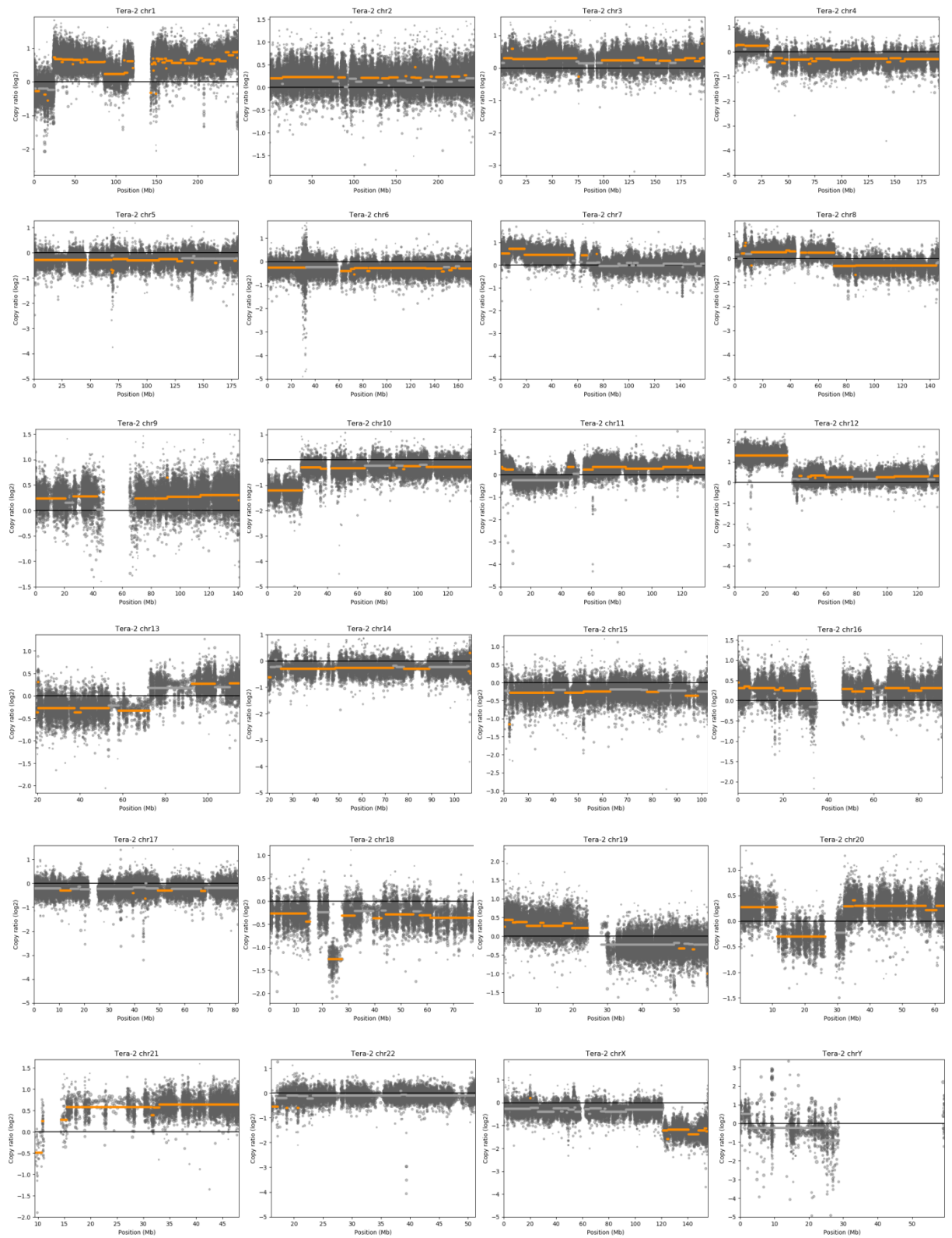
V průběhu analýzy dat získaných celoexomovým sekvenováním byly zhodnoceny a porovnány změny v počtech genových kopií mezi CDDP-exponovanými a CDDP-naivními buněčnými liniemi. Takto získaná data ukázala mnohočetné změny v počtech genových kopií u všech analyzovaných buněk. Mimo pro TGN typické změny CNV – trizomie krátkého raménka chromozomu 12, byly nalezeny i rekurentní změny počtu genových kopií na chromozomech 1, 20, 21 a X. Dále byly v souvislosti s CDDP rezistencí u NCCIT nalezeny i další nové změny na chromozomech: 1, 4, 8, 9, 10, 13, 17, 18 a X (Obr. 11).



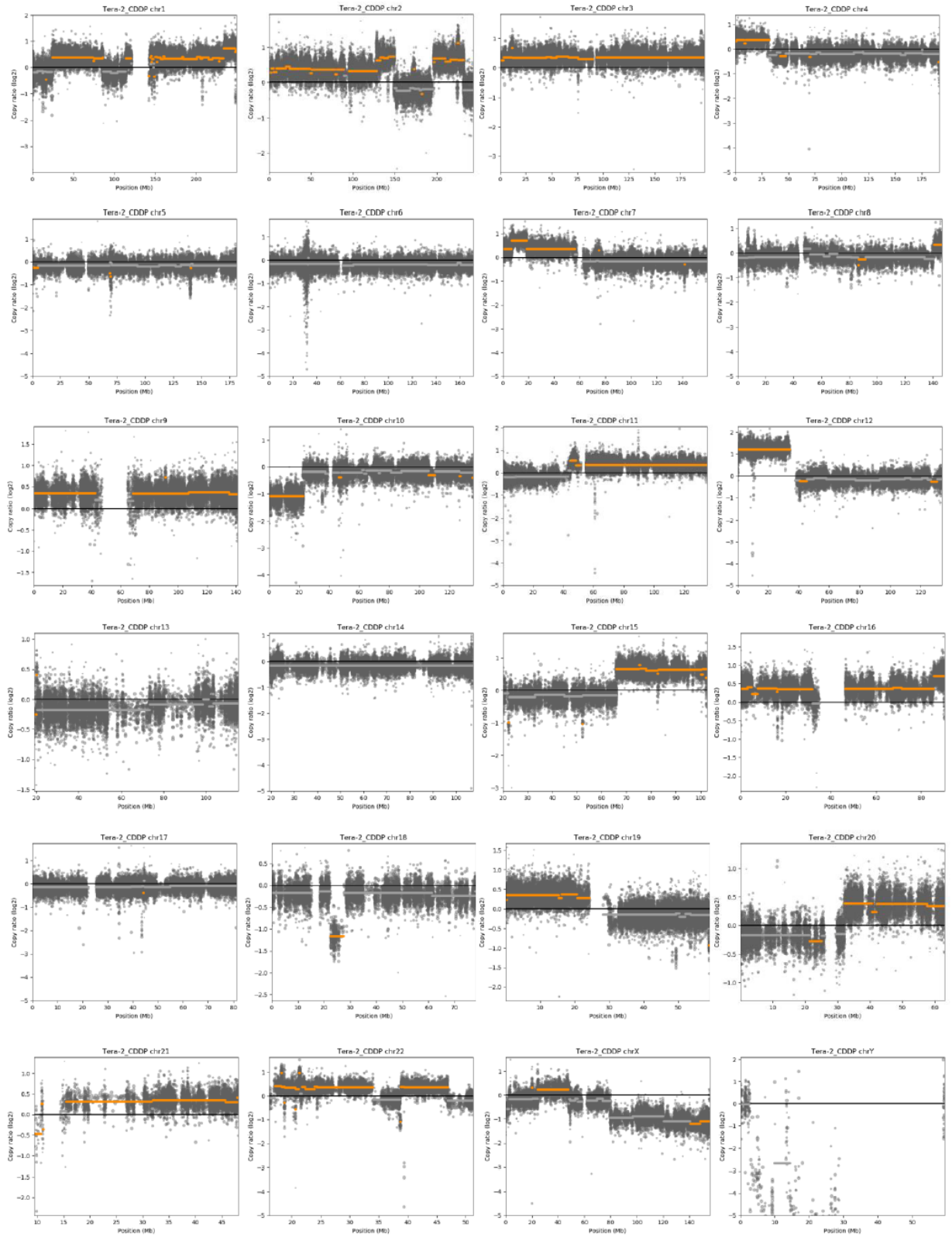
(A)



(B)



(C)



(D)

Obrázek 11: CNV u CDDP-exponovaných a CDDP-naivních buněčných linií. Vizualizace na základě datové analýzy WES sekvenačních dat, které byly normalizovány a porovnány se souborem všech kontrolních vzorků po jeho sjednocení (tzv. poolování). Segmentální změny v počtech genových kopií jsou značeny oranžovou linkou, normální počet kopií je značen šedou linkou. (A) CDDP-naivní NCCIT buňky, (B) CDDP-exponované NCCIT buňky, (C) CDDP-naivní Tera-2 buňky, (D) CDDP-exponované Tera-2 buňky.

4.1.6. Stanovení mutační zátěže (TMB)

Stanovení mutační zátěže u CDDP-exponovaných a CDDP-naivních buněčných linií ukázalo mírně zvýšený počet variant u buněk pěstovaných v přítomnosti cisplatin v porovnání s původními buněčnými liniemi. Nebyl zjištěn významný rozdíl v počtu získaných variant mezi NCCIT CDDP-naivními a Tera-2 CDDP-naivními, ani mezi NCCIT CDDP-exponovanými a Tera-2 CDDP-exponovanými buněčnými liniemi. v rámci různých buněčných linií NCCIT a Tera-2 (Tab. 13).

Tabulka 13: Mutační zátěž u buněčných linií NCCIT a Tera-2

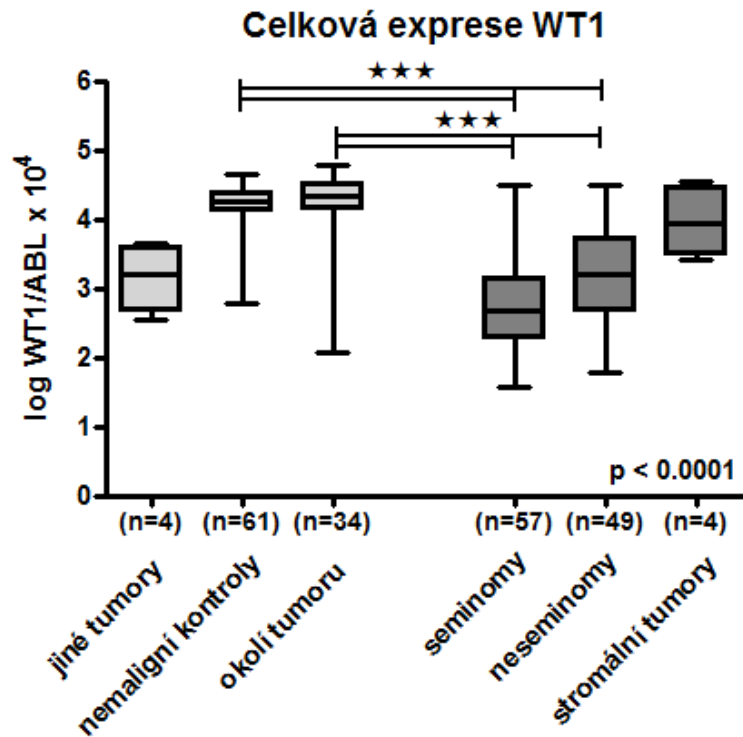
Buněčná linie	CDDP-naivní [varianty/1Mbp]	CDDP-exponovanými [varianty/1Mbp]	Poměr
NCCIT	139.5	152.5	1.09
Tera-2	143.8	152.3	1.06

4.2. Analýza klinických vzorků pacientů s TGN

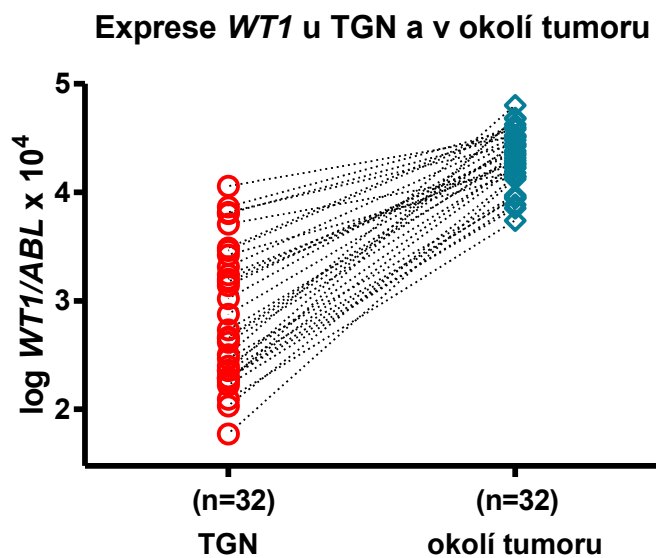
4.2.1. Celková exprese genu *WT1* u germinálních nádorů varlat

Hladina exprese mRNA genu *WT1* byla ve všech patientských germinálních nádorových vzorcích signifikantně nižší v porovnání s kontrolními vzorky, přičemž u seminomových nádorů byla tato exprese nižší než u neseminomů. Hladina exprese *WT1* v kontrolních vzorcích byla tedy vždy vyšší a v užším rozmezí naměřených hodnot u obou druhů použitých kontrol. U maligních negerminálních nádorů varlat byla exprese genu *WT1* srovnatelná s hladinami změřenými u TGN, především u neseminomů. Stromální testikulární nádory vykazovaly vysokou hladinu exprese genu *WT1* (Obr. 12). U dostupných párových vzorků pocházejících z nádoru a kontroly stejného pacienta byl naměřen vždy konstantní rozdíl kolem 1 řádu (Obr. 13). Z dalších našich měření bylo zjištěno, že hodnoty exprese *WT1* se významně neměnily v rámci vzorků pocházejících z různých oblastí tumorové tkáně, ani se

významně nelišily mezi různými nenádorovými kontrolami. Nebyla zjištěna korelace mezi expresí *WT1* a dalšími klinickými daty pacientů jako například věk či klinické stádium onemocnění.



Obrázek 12: Celková exprese mRNA *WT1*. Porovnání mezi seminomy, ne seminomy, stromálními tumory a okolím tumoru, nemaligními kontrolami a jinými tumory. Statistická signifikance ($*** \leq 0,0001$)

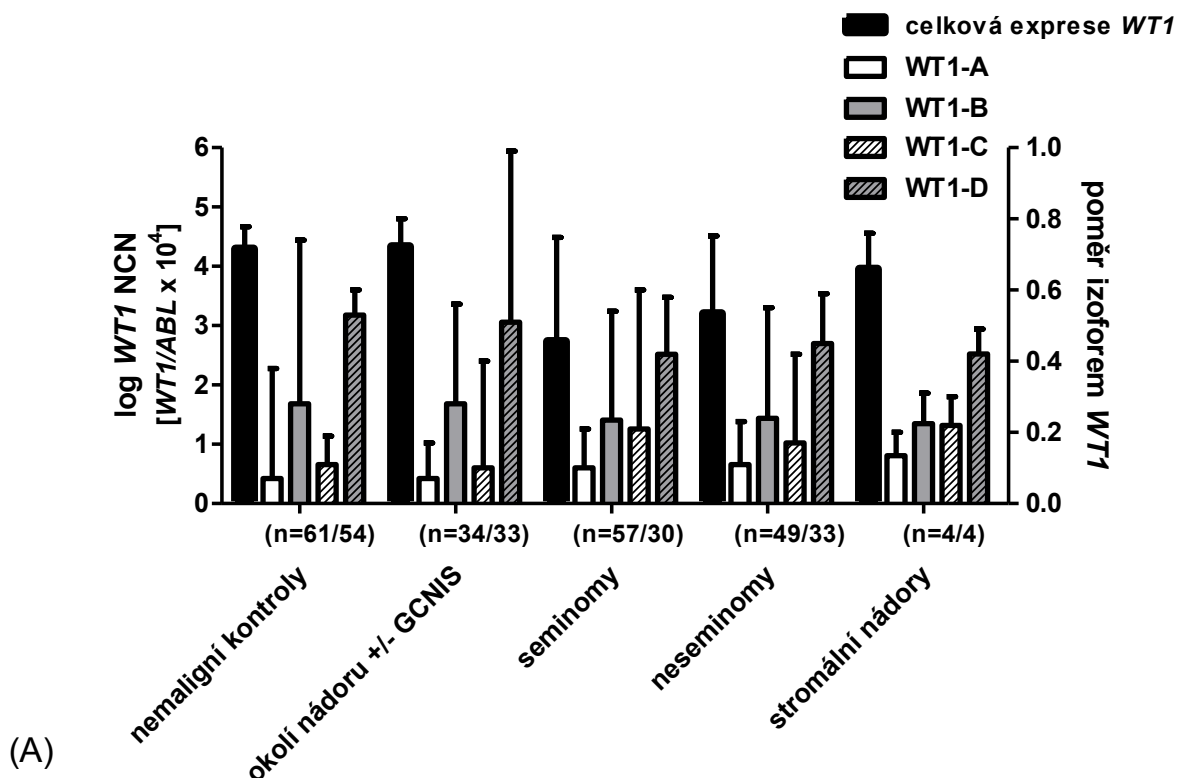


Obrázek 13: Celková exprese *WT1*. Porovnání mezi TGN a okolím tumoru.

4.2.2. Změna expresního vzorce izoform genů *WT1*

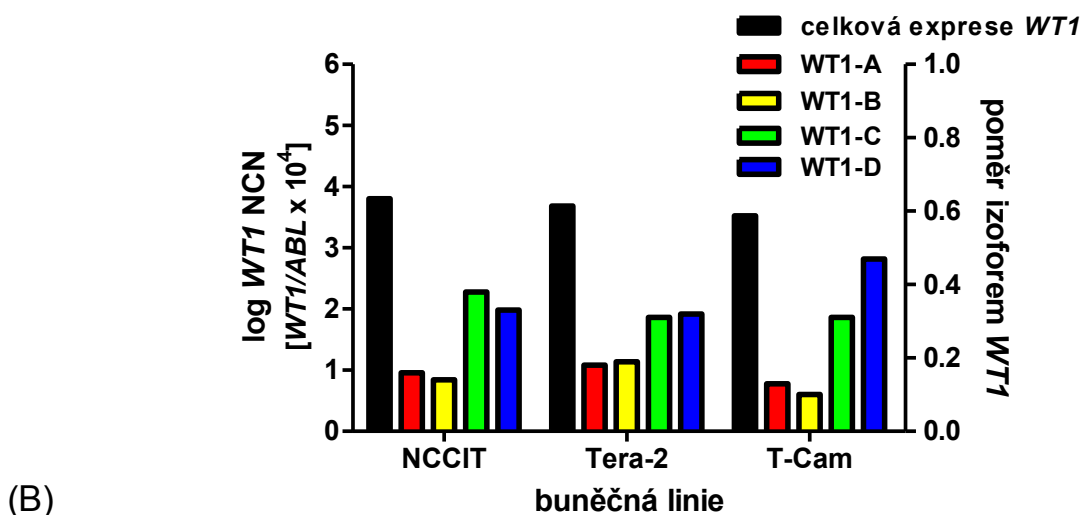
V rámci stejné patientské kohorty byla též hodnocena exprese 4 hlavních izoform genů *WT1*. U kontrolních vzorků byl patrný ustálený vzorec exprese izoform genů *WT1* bez ohledu na druh kontrolního materiálu. U takto změřených kontrol byla prokázána zvýšená exprese izoform, které obsahovaly exon 5. Nejvíce exprimovaná byla izoforma D a dále izoforma B. Na druhé straně nízká exprese byla vždy pozorována u izoform A a C, které neobsahují exon 5. Tento vzorec byl velice odlišný od všech germinálních nádorů, kde byla oproti kontrolám detekována relativně zvýšená exprese izoform A a C. Podobné expresní vzorce izoform genů *WT1* byly u dalších nádorů varlat, a to i testikulárních stromálních nádorů a též u testikulárních germinálních buněčných linií. Naopak, poměr izoform obsahujících fragment KTS byl velmi stabilní ve všech typech vyšetřovaných vzorků (Obr. 14, 15 a 16).

Expresa celkového *WT1* a izoform *WT1* v klinických vzorcích TGN a v kontrolních vzorcích



(A)

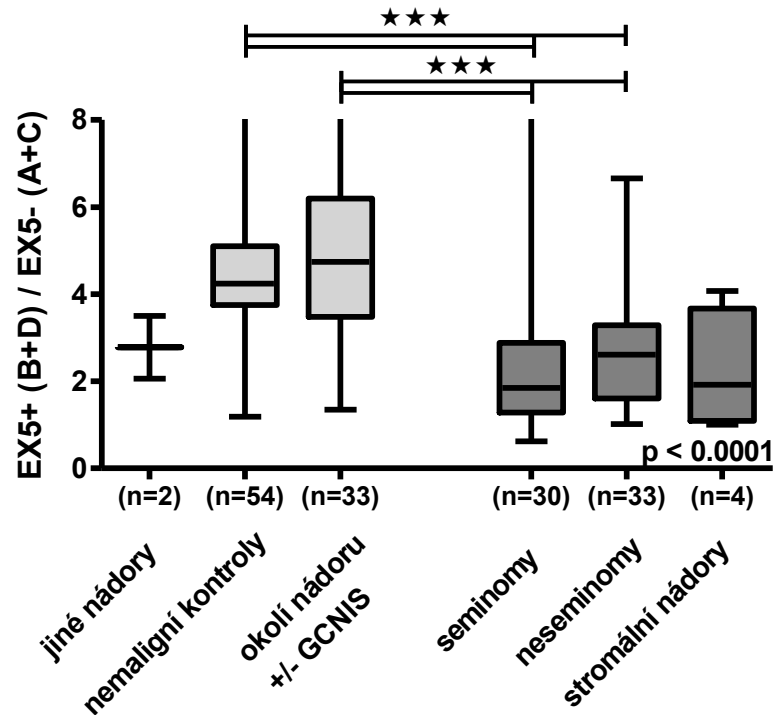
Expresa *WT1* v buněčných liniích TGN



(B)

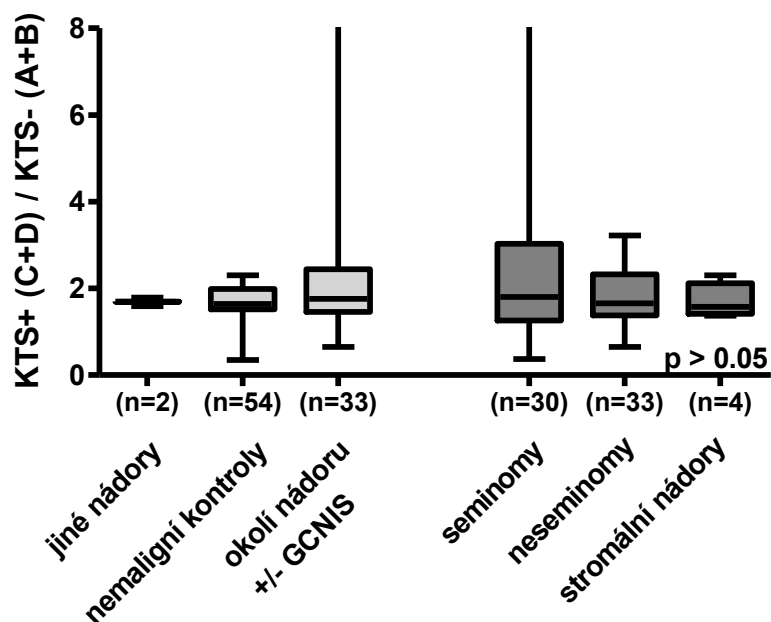
Obrázek 14: (A) Celková exprese genu *WT1* a izoform *WT1*. Porovnání mezi seminomy, neseminomy, stromálními tumory, okolím tumoru a nemaligními kontrolami. (B) Pro porovnání zjištěné exprese v buněčných liniích TGN.

Expresse EX5 pozitivních/EX5 negativních izoforem *WT1* u nádorových vzorků TGN a kontrol



Obrázek 15: Expresse *WT1* vyjádřená poměrem EX5+ (izoformy B a D) / EX5- (izoformy A a C) izoforem *WT1*. Porovnání mezi seminomy, ne seminomy, stromálními tumory a okolím tumoru, jinými nádory a nemaligními kontrolami. Statistická signifikance (***) $\leq 0,0001$.

Expresse KTS pozitivních/KTS negativních izoforem *WT1* u nádorových vzorků TGN a kontrol



Obrázek 16: Expresse *WT1* vyjádřená poměrem KTS+ (izoformy C a D) /- (izoformy A a B) izoforem *WT1*. Porovnání mezi seminomy, ne seminomy, stromálními tumory a okolím tumoru, nemaligními kontrolami a jinými nádory. Statistická signifikance ($p > 0,05$).

4.2.3. Mutační analýza genu *WT1*

U TGN pacientů byla pomocí Sangerova sekvenování vyšetřena přítomnost mutací v exonech 7 a 9 genu *WT1*, které jsou považovány za úseky s nejčastějším výskytem mutací (hot spots) tohoto genu. U žádného z vyšetřených pacientů nebyla přítomná mutace v genu *WT1*. U 16 (33 %) pacientů byl přítomen jednobázový polymorfismus rs16754 a u 1 (2 %) pacienta byla prokázána přítomnost polymorfismu v intronové oblasti genu rs5030274 (Tab. 14). Ani u jedné z těchto dvou variant není známá klinická signifikance a neprokázala se ani asociace s klinickým stavem daného pacienta.

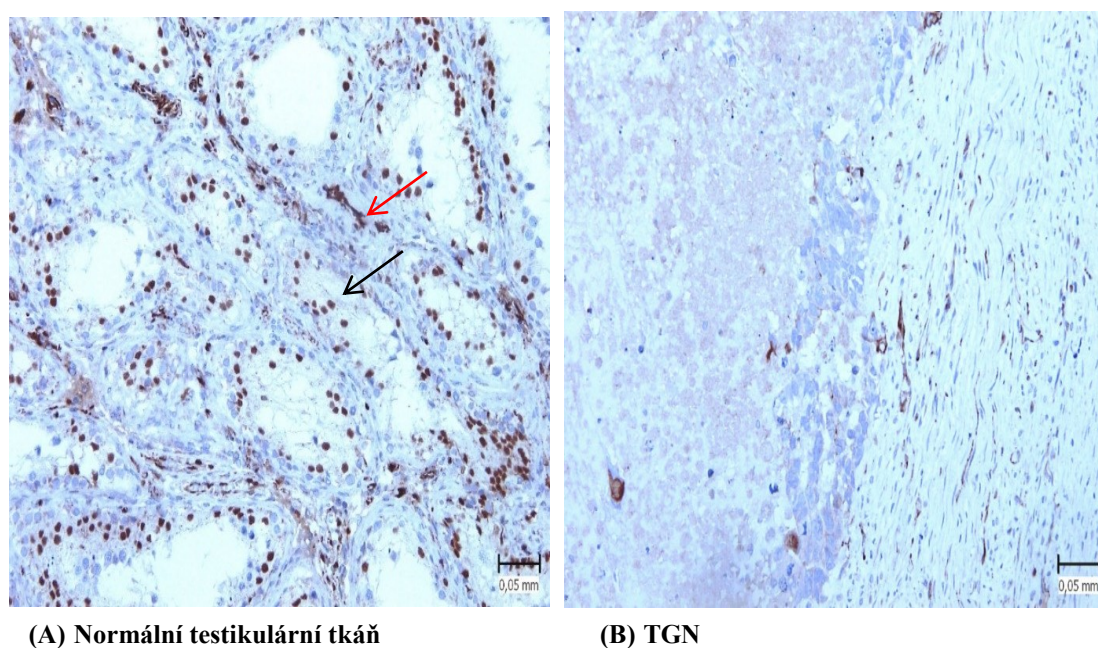
V rámci sekvenování NGS byla přítomnost mutací v celé délce genu *WT1* detekována v 50 % vzorků, ale s nízkou frekvencí (která může být pod hranicí detekce Sangerova sekvenování).

Tabulka 14: Výsledky mutační analýzy genu *WT1*

Sangerovo sekvenování exonů 7 a 9 (48 nádorových vzorků)	Sekvenování nové generace (NGS) (27 nádorových vzorků)
detekovány pouze SNPs	mutace přítomny u 50 % vzorků
rs16754 – synonymní u 16 vzorků (33 %) rs5030274 – v intronové oblasti u 1 vzorku (2 %)	(ale v rámci každého vzorku s nízkou frekvencí zastoupení – do 10-20 %)

4.2.4. Exprese proteinu WT1

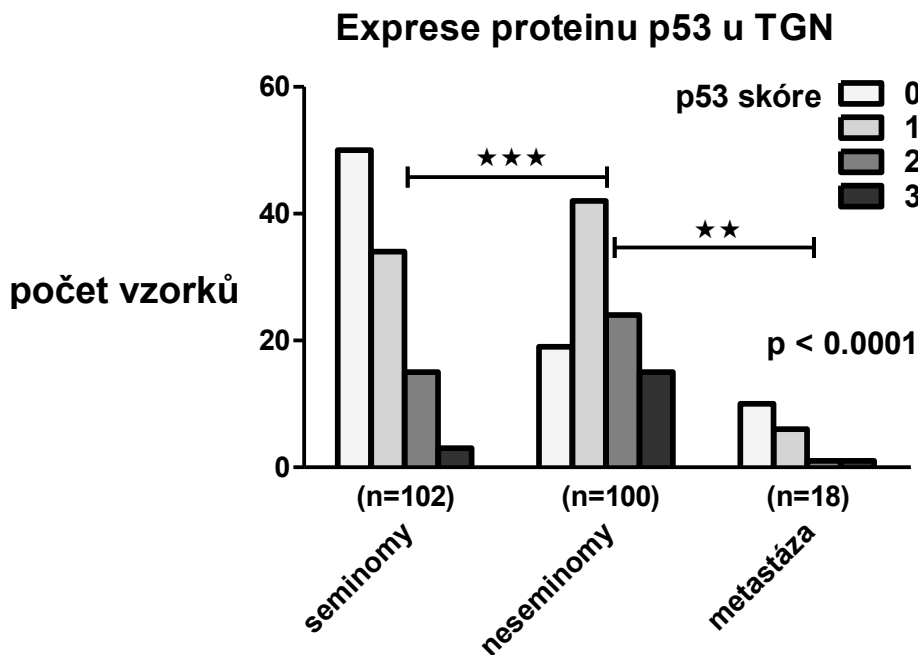
Exprese proteinu WT1 byla detekována imunohistochemicky ve vzorcích TGN a kontrol fixovaných v parafinových bločcích. Protein WT1 byl prokazatelný v kontrolách, ale v buňkách TGN nebyla exprese proteinu WT1 detekovatelná (Obr. 17). Ve vzorcích stromálních nádorů byla exprese proteinu WT1 detekovatelná v závislosti na diferenciaci buněk tvořících nádor.



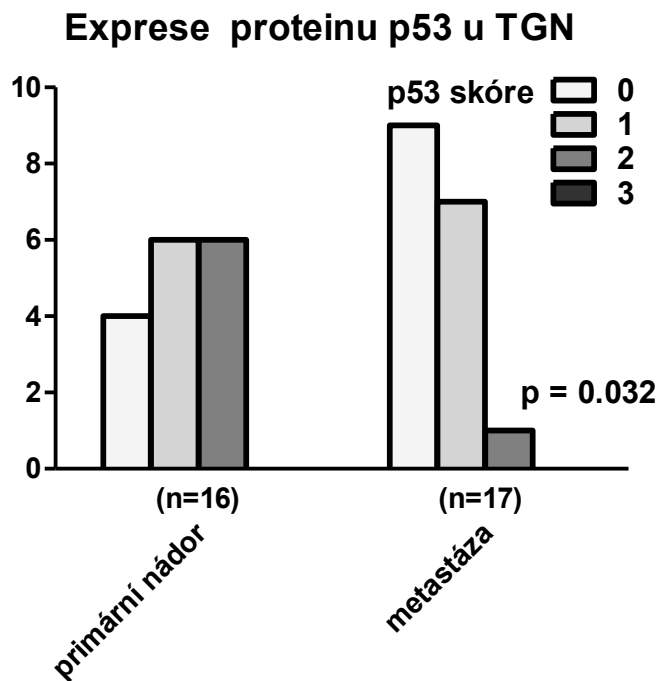
Obrázek 17: Imunohistochemické barvení proteinu WT1. (A) Normální testikulární tkáň - protein WT1 je přítomen v intersticiálních buňkách semenotvorných kanálků (černá šipka) i v intersticiální tkáni kolem cév (červená šipka), především v intranukleární lokalizaci; (B) Reprezentativní vzorek TGN – v jádrech buněk TGN není přítomnost proteinu WT1 detekovatelná. Slabá pozitivita může být pozorována v intersticiální tkáni.

4.2.5. Exprese proteinu p53

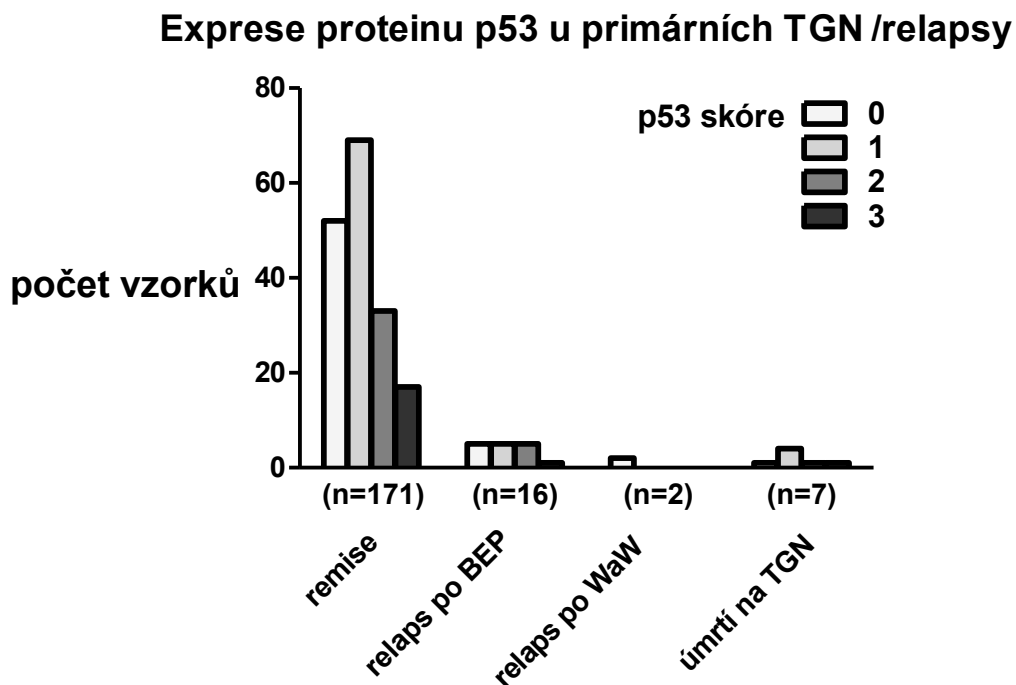
U většiny vzorků TGN byla zjištěna nízká hladina exprese p53. Jen u jedné čtvrtiny z nádorů byla zjištěna signifikantně zvýšená exprese tohoto proteinu, přičemž tato zvýšená hladina byla z velké většiny u ne seminomů. Metastatické vzorky vykazovaly nízkou expresi p53, kdy bylo zřejmé snížení hodnot exprese p53 mezi primárním vzorkem tumoru a jeho metastázou (Obr. 18 a 19). Rozdíly v expresi p53 nebyly signifikantně potvrzeny mezi pacienty v remisi a pacienty u nichž nastal relaps TGN (Obr. 20).



Obrázek 18: Exprese proteinu p53 v primárních seminomech a ne seminomech a v metastatických vzorcích TGN. Statistická signifikance (** $\leq 0,001$ *** $\leq 0,0001$).



Obrázek 19: Expresie proteinu p53 v primárních a metastatických vzorcích TGN. Statistická signifikance ($p = 0,032$).



Obrázek 20: Expresie proteinu p53 u pacientů v remisi a u pacientů po relapsu onemocnění ($p > 0,05$).

4.2.6. Mutační analýza genu *BRAF*

Jednobodová mutace 1799T>A (V600E) v genu *BRAF* byla prokázána u 2 (1 %) z 210 vyšetřených vzorků pacientů s TGN, přítomnost mutace byla potvrzena Sangerovým sekvenováním. V jednom z případů se jednalo o seminomový a v druhém o neseminomový nádor, přičemž ani u jednoho z pacientů nedošlo k relapsu onemocnění.

V kohortě pacientů analyzovaných pomocí sekvenování NGS nebyla tato mutace detekována, ale byly detekovány jiné varianty v tomto genu – viz kapitola 4.2.8.

4.2.7. Analýza mutací u patientských vzorků pomocí masivně-paralelního sekvenování

U tří ze čtyř patientských vzorků osekvenovaných celoexomovým sekvenováním byly nalezeny získané somatické genové aberace s potenciálně patogenním významem. U pacienta, který zemřel v důsledku progradujícího germinálního nádoru bylo nalezeno 6 missense mutací, z nichž jedna byla přítomna ve vysoké frekvenci (45 % všech readů) v kódující sekvenci genu *TFAP2C*, a další v genu *TRERF1* (30 % všech readů). Ve vzorku dalšího z pacientů byla nalezena stop/gain mutace v sekvenci genu *DOHH*, metaloenzymu hrajícího roli v metabolismu lysinu. U posledního z takto osekvenovaných pacientů bylo nalezeno 7 missense mutací včetně mutace v genu *RINI* účastnícího se signální dráhy *RAS*, *FOXG1* účastnícího se signální dráhy *FOXO*, a v sekvenci genu *DMRTA1* kódujícího transkripční faktor (Tab. 15).

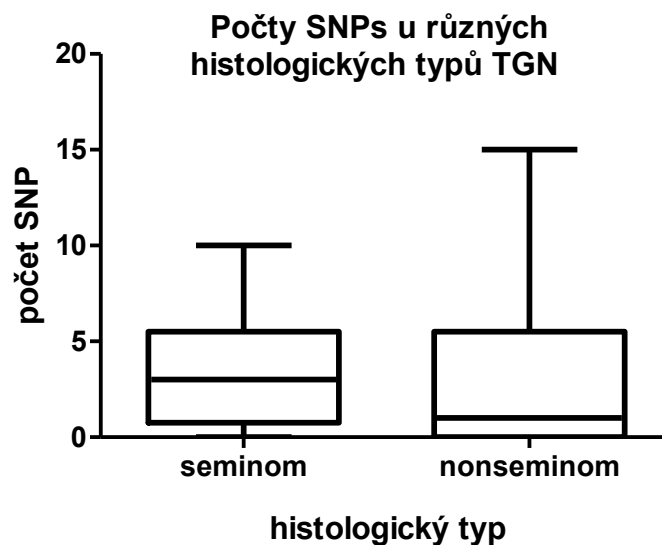
Tabulka 15: Varianty detekované celoxomovým sekvenováním u patientských vzorků TGN.

ID	chr	poz	ref	var	var frekv	var typ	gen	funkce
pt2	chr5	94620080	G	T	33 %	missense	<i>MCTP1</i>	transportér kationtů
pt2	chr5	156566309	A	T	32 %	missense	<i>MED7</i>	transkripční koaktivátor
pt2	chr17	79650826	G	T	30 %	missense	<i>ARL16</i>	buněčný antivirový protein
pt2	chr6	42227382	C	T	30 %	missense	<i>TRERF1</i>	transkripční faktor
pt2	chr20	55206264	C	T	45 %	missense	<i>TFAP2C</i>	transkripční faktor
pt2	chr7	45123888	C	T	41 %	missense	<i>NACAD</i>	buněčný antivirový protein
pt3	chr19	3491580	G	T	30 %	stop/gained	<i>DOHH</i>	metaloenzym
pt4	chr3	42982835	G	T	38 %	missense	<i>KRBOX1</i>	represor transkripce
pt4	chr11	66101644	G	T	38 %	missense	<i>RINI</i>	RAS efektorový protein
pt4	chr11	121323287	G	T	38 %	missense	<i>SORL1</i>	proteinový transportér
pt4	chr19	47259048	C	G	35 %	missense	<i>FKRP</i>	transferáza
pt4	chr3	27762912	G	T	33 %	missense	<i>EOMES</i>	transkripční faktor
pt4	chr9	22447573	G	T	30 %	missense	<i>DMRTA1</i>	transkripční faktor
pt4	chr14	29236541	G	T	30 %	missense	<i>FOXG1</i>	transkripční faktor

chr: chromozom, poz: pozice, ref: reference, var: varianta, var frekv: frekvence varianty, var typ: typ varianty

V souboru obsahujícího data z amplikonového sekvenování byl jako gen mutovaný u nejvyššího počtu pacientů identifikován gen *NSDI* (mutován u 9 z 27 pacientů – 33 %). Tento gen kóduje histonovou methyltransferázu. Další gen pro methyltransferázu *SETD2* byl mutován u 3 z 27 (11 %) pacientů. Varianty v dalších třech genech (*FANCA*, *IL21R* a *JAK1*) byly nalezeny u více než dvou pacientů. Mutace detekované s nejvyšší frekvencí variant (91-100 %) tj. v homozygotním stavu byly nalezeny v genech *ATRX*, *ARID2*, *FANCA*, *MDM2*, *PDGFRA*, *NSDI*, *SETD2* a *TSHR*. U jediného pacienta s progredujícím nádorem, který v tomto souboru na TGN zemřel, bylo nalezeno nejvíce mutací (celkem 15) (Tab. 16).

Při porovnání výsledků sekvenování u buněčných linií a pacientů s TGN byl gen *ATRX* jediný, jehož aberace byly přítomné u obou typů analyzovaných vzorků. Varianty v tomto genu kódujícím chromatin-remodelující enzym byly nalezeny u 2 pacientů a zároveň byly v jeho sekvenci nalezeny 3 homozygotní varianty nabyté nově v procesu získání rezistence na cisplatinu v CDDP-exponovaných NCCIT buňkách (Tab. 12). Hodnocení počtu jednobázových variant v závislosti na klinickém stádiu onemocnění ukázala na možnou souvislost mezi vysokým počtem aberací a progresí TGN. Na druhou stranu nebyly pozorovány rozdíly v závislosti na histologickém typu TGN (Obr. 21 a 22).



Obrázek 22: Počty jednobázových polymorfismů u různých histologických typů TGN.

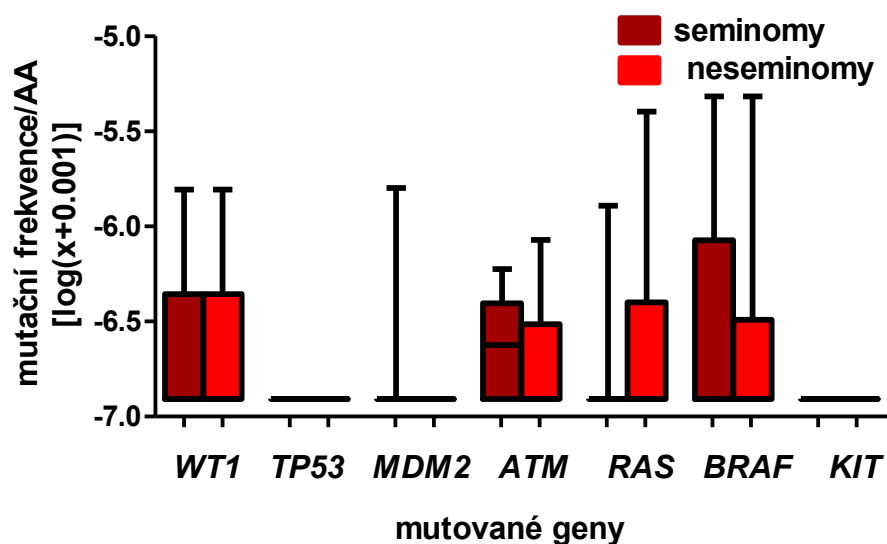
4.2.8. Analýza mutací detekovaných NGS ve vybraných genech s potenciálním klinickým významem pro TGN (*BRAF*, *TP53*, *RAS*, *WT1* a *KIT*)

Dále jsme se zaměřili na podrobnější analýzu aberací v genech hrajících potenciální roli v patogenezi TGN, tj. na gen *TP53* a geny regulující dráhu p53 - *ATM*, *MDM2*; *KIT*, skupinu genů *RAS* (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*), dále také na *BRAF* a *WT1*. Hodnotili jsme mutace a varianty v těchto genech vyskytující se nově v nádorových vzorcích v porovnání s kontrolami, ale s jinými filtračními kritérii, zahrnujícími i varianty s nižší frekvencí než v předchozích analýzách.

Celkem bylo detekováno 43 SNV s missense nebo nonsense efektem na daný protein pro tyto vybrané geny v 16 z 26 osekvenovaných vzorků. Medián počtu detekovaných variant na pacienta/vzorek byl 3, u jednotlivých pacientů bylo zachyceno 0-10 variant.

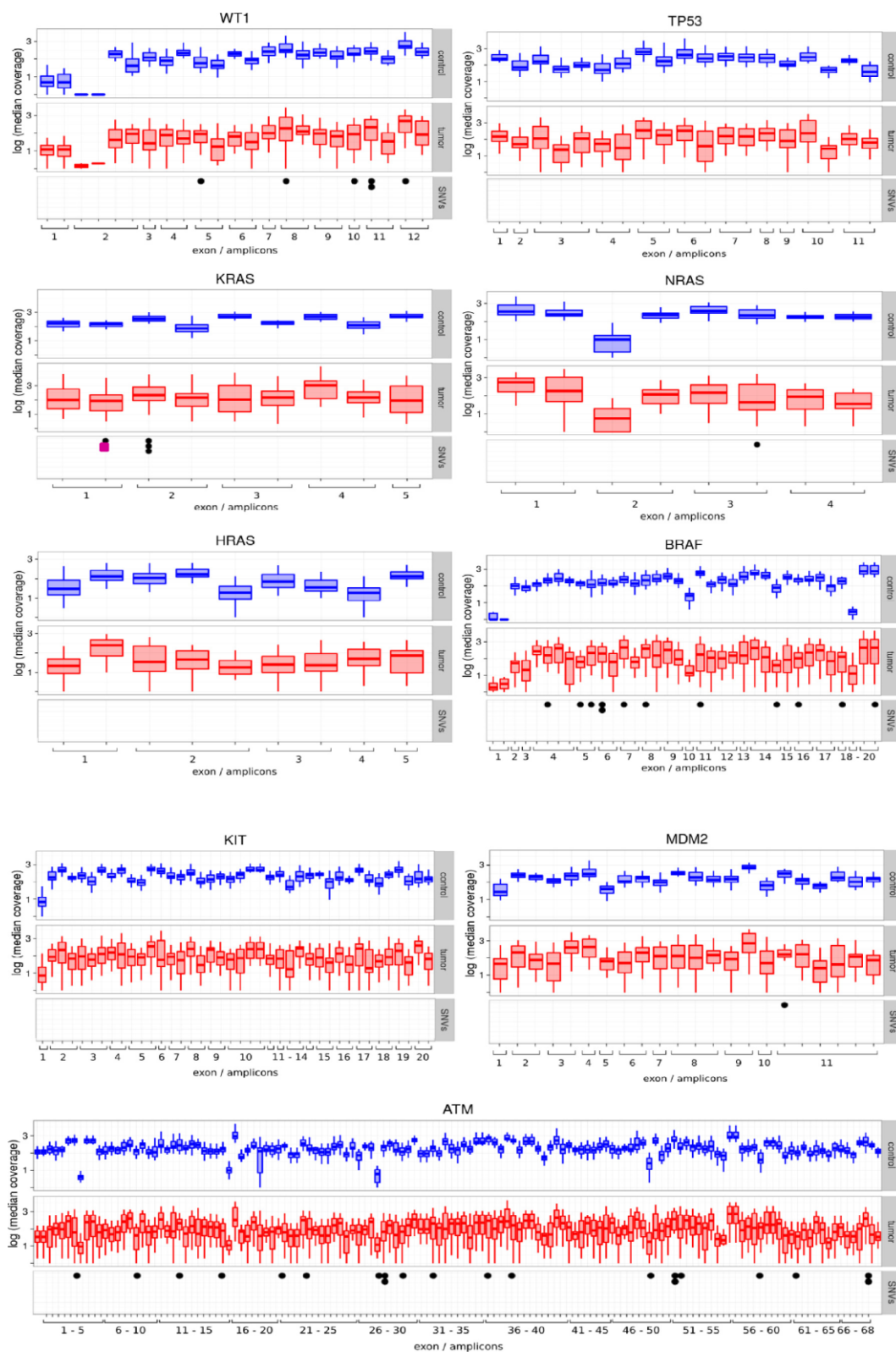
V datech z tohoto souboru byly objeveny varianty v genu *ATM* u 11 osekvenovaných pacientů (42 %), varianty v genu *BRAF* byly přítomny u 7 pacientů (27 %) a gen *WT1* obsahoval varianty u 6 pacientů (23 %). U *RAS* mutací se jednalo o 6 *KRAS* a 1 *NRAS* mutaci u celkem 5 pacientů (19 %). Identická patogenní mutace byla identifikována v genu *KRAS* (p.Gly12Cys, COSM516) u dvou z vyšetřených nádorových vzorků pacientů a jejich přítomnost byla potvrzená i následným Sangerovým sekvenováním. Gen *MDM2* byl mutován u 1 pacienta (4 %). Geny *TP53* a *KIT* nebyly mutovány u žádného z pacientů.

Nebyly nalezeny významné rozdíly v počtu variant mezi seminomy a ne seminomy, přechemž byla pozorována tendence pro vyšší výskyt variant v genu *BRAF* u seminomů a varianty v genech *RAS* byly více časté u ne seminomů (Obr. 23).

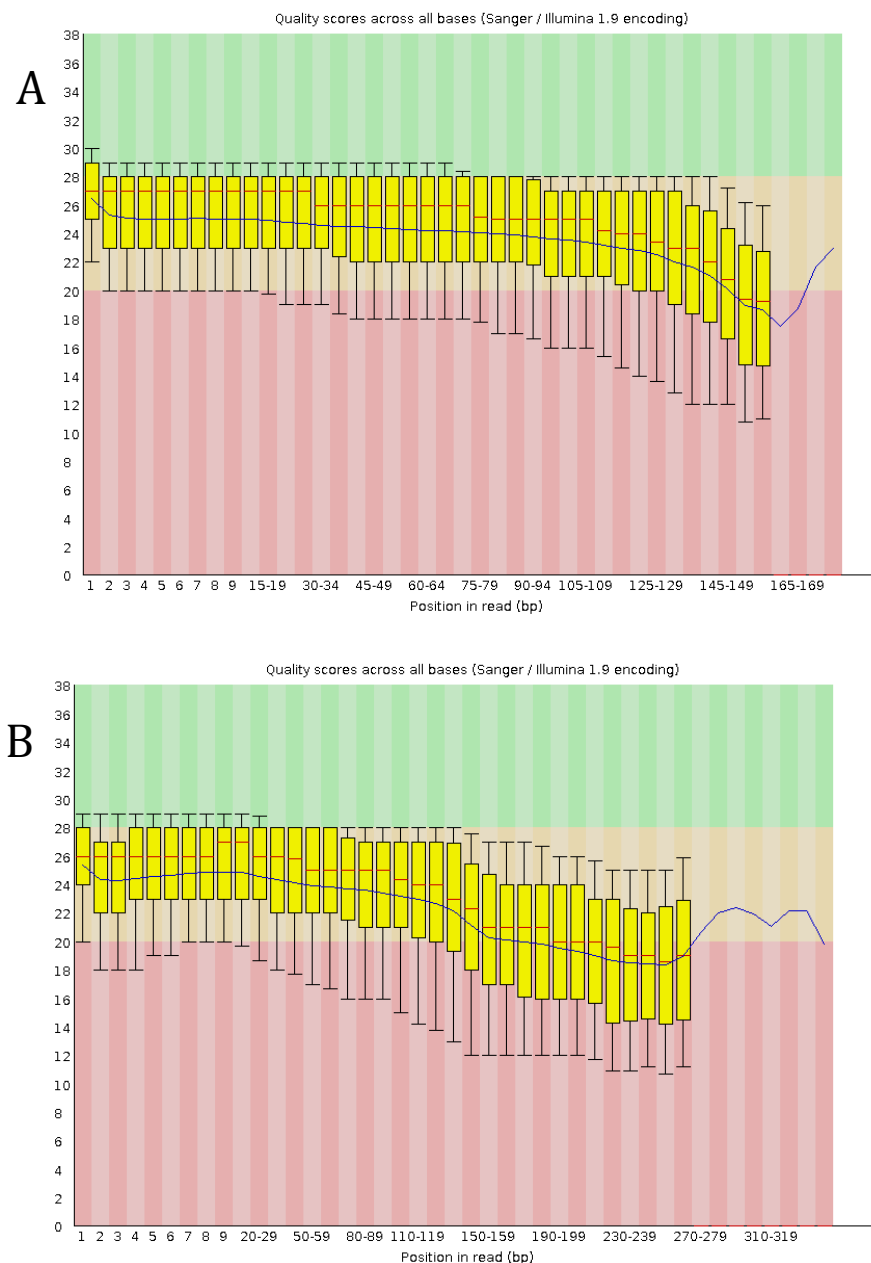


Obrázek 23: Mutační frekvence ve vybraných genech vypočtena s ohledem na délku jednotlivých genů.

Provedené testy kontroly kvality ukázaly, že frekvence detekovaných mutací není způsobena rozdíly v pokrytí daného genu ani jinými případnými rozdíly v kvalitě sekvenování (Obr. 24). Kvalita sekvenování z nádorových vzorků FFPE a kontrolních vzorků z periferní krve daného pacienta byly srovnatelné (Obr. 25).



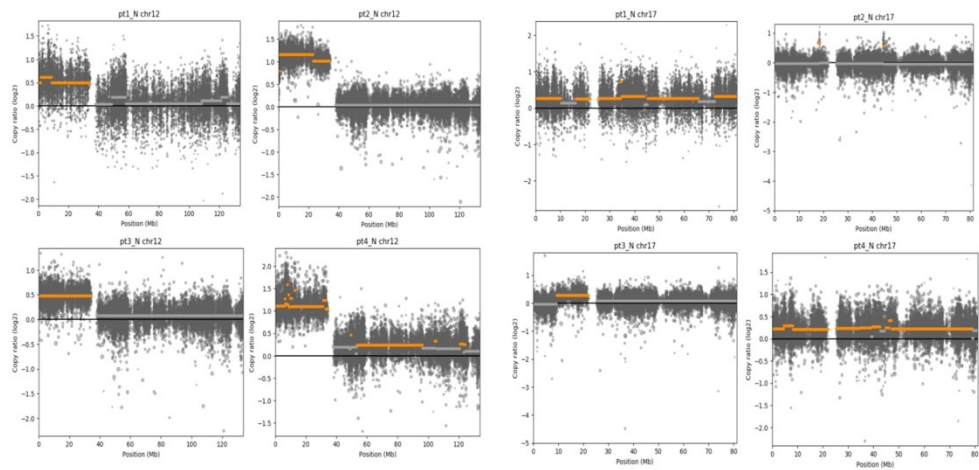
Obrázek 24: Průměrné pokrytí vzorků pro vybrané geny z ampliconového sekvenování, boxploty ukazují rozdělení pro jednotlivé amplikony. Černé tečky představují mutace detekované v každém ampliconu nádorových vzorků, fialový čtverec znamená stejné mutace přítomné ve 2 různých vzorcích. Značky na ose x znamenají sekvenované amplikony, které jsou seskupeny do exonů označených čísly.



Obrázek 25: Primární data z ampliconového sekvenování analyzovaná pomocí FastQC, (A) sekvenční kvalita reprezentativního vzorku TGN fixovaného v FFPE; (B) odpovídající kontrola vzorku periferní krve.

4.2.9. Analýza změn v počtech genových kopií (CNV) u patientských vzorků

Další analýza dat celoexomového sekvenování patientských vzorků byla zaměřená na detekci CNV. Jako reference k porovnání zisku nebo ztráty na chromozomální úrovni zde sloužily vzorky pocházející z nenádorové tkáně. Potvrdila se rekurence amplifikace krátkého raménka chromozomu 12. Dále je také opakujícím se jevem i amplifikace chromozomu 17 v celé délce nebo jeho částí (Obr. 26 a Tab. 17).



Obrázek 26: CNV u TGN patientských vzorků. Vizualizace na základě datové analýzy WES sekvenačních dat, které byly normalizovány a porovnány se souborem kontrolních vzorků po jeho sjednocení (tzv. poolování). Příprava sekvenačních knihoven i sekvenace probíhaly za stejných podmínek pro nádorové i kontrolní vzorky. Segmentální změny v počtech genových kopií jsou značeny oranžovou linkou, normální počet kopií je značen šedou linkou.

Tabulka 17: Počet dlouhých delecí nebo amplifikací, tj. CNV u patientských nádorových a kontrolních vzorků (vztaženo k referenčnímu souboru tvořeného z kontrolních vzorků po jejich sjednocení (tzv. poolování). T- nádor, C – kontrolní tkáň.

Paciet (T/C)	pt1(T)	pt1(C)	pt2(T)	pt2(C)	pt3(T)	pt3(C)	pt4(T)	pt4(C)
chr1	2	0	1	3	0	0	14	2
chr2	3	1	0	0	1	0	4	0
chr3	1	0	0	1	1	0	2	0
chr4	0	0	2	0	0	0	1	0
chr5	0	2	2	0	0	0	1	0
chr6	0	0	1	0	1	0	0	0
chr7	8	1	0	0	0	0	0	0
chr8	0	1	5	0	0	0	2	2
chr9	0	2	2	1	2	4	1	0
chr10	0	2	4	0	0	0	0	0
chr11	1	1	6	1	1	1	1	0
chr12	3	0	3	0	1	0	21	0
chr13	1	0	1	0	0	0	0	0
chr14	0	0	0	0	0	0	2	0
chr15	0	1	0	0	0	0	0	0
chr16	0	0	0	0	0	2	0	0
chr17	7	2	2	2	1	0	9	2
chr18	0	0	4	0	1	0	0	0
chr19	1	2	1	2	0	0	0	0
chr20	0	0	0	0	0	0	0	0
chr21	1	0	1	0	0	0	2	0
chr22	1	0	0	0	1	0	3	3
chrX	2	0	0	0	0	0	0	0
chrY	0	0	1	0	0	0	0	0

5. Diskuze

Zásadní otázkou v léčbě TGN se jeví objasnění jejich výjimečné citlivosti na cisplatinu a příčin vedoucích ke ztrátě této citlivosti. Vysvětlení jevů vedoucích k takto vysoké senzitivitě by mohlo mít význam pro strategii léčby nádorů rezistentních na cisplatinu, pro něž v této chvíli není dostačující množství terapeutických možností. V terapii TGN není dosud zaveden žádný molekulární prognostický ani prediktivní faktor, který by mohl být využíván ke stratifikaci pacientů. Identifikace takového markeru by mohla vést k větší personalizaci léčby TGN s co nejvyšší účinností a nejmenšími vedlejšími efekty pro pacienta. V této práci jsme vycházeli ze zmíněných předpokladů a snažili jsme se zodpovědět alespoň část otázek týkajících se TGN s ohledem na zlepšení jejich léčby.

Roli různých genů a molekulárních aberací v patogenezi TGN a vývoji jejich rezistence na cisplatinu jsme studovali experimentálně na testikulárních germinálních buněčných liniích a také na souborech klinických vzorků získaných od pacientů s TGN.

Pro bližší studium cisplatinové rezistence u TGN jsme se rozhodli vytvořit testikulární buněčné linie rezistentní na cisplatinu a studovat jejich proliferativní a molekulárně-genetické vlastnosti. Buněčné linie NCCIT a Tera-2 jsou neseminomové, obsahují buňky embryonálního karcinomu, NCCIT zahrnuje také složku teratokarcinomu. Obě buněčné linie vykazovaly podobnou počáteční citlivost na cisplatinu. S identickým přístupem intermitentní expozice na cisplatinu a doby regenerace vyvinula NCCIT významnou rezistenci vůči danému cytostatiku (10krát vyšší ve srovnání s původní buněčnou linií, podobnou dříve publikovaným studiím (Oechsle *et al.*, 2011a; Oing *et al.*, 2018), zatímco Tera-2 si udržela svou citlivost a nebylo možné dosáhnout významného zvýšení rezistence. Pro buňky embryonálního karcinomu je typická vysoká chemosenzitivita a ta je spojena s embryonálními rysy, které jsou pro tyto nádorové buňky typické. Teratokarcinom oproti tomu představuje více diferencovanou variantu TGN a dokonce i v klinické praxi je tento subtyp TGN charakterizován častou rezistencí na chemoterapii, což může být jedním z vysvětlení pro námi dosaženou vysokou úroveň rezistence na cisplatinu u linie NCCIT, obsahující teratokarcinomovou složku. Dále jsme se zaměřili na analýzu buněčného cyklu a proliferace, kde jsme zjistili přibližně 10% nárůst buněk přítomných ve fázi G0 / G1 buněčného cyklu. Je obecně známo, že je cytotoxická chemoterapie většinou málo účinná pro rakovinné buňky ve fázi G0 / G1 a rezistentní rakovinné buňky v této fázi mohou dlouhodobě přežívat (Jedema *et al.*, 2003, 2004; Yano *et al.*, 2014). Tato situace byla pozorována v buněčné linii, která vyvinula rezistenci na cisplatinu. Dále bylo při charakterizaci těchto rezistentních buněk prokázáno signifikantní snížení počtu buněk ve fázi S. Tyto buňky také nevykazovaly žádné

zvýšení apoptózy po expozici CDDP na rozdíl od zbývajících buněčných linií. Tato data naznačují změnu ve specifické signalizaci po poškození DNA (DDR) z embryonálního typu, který je typický pro TGN (primární aktivace apoptotické dráhy), k běžnému typu obvyklému pro ostatní solidní nádory (aktivace kontroly buněčného cyklu a opravné mechanismy DNA). Dokumentovaná počáteční vyšší míra proliferace buněčné linie NCCIT mohla také usnadnit rozvoj rezistence CDDP rychlou akumulací potenciálně funkčních mutací a rychlejší selekcí rezistentních buněk.

Za nejvýznamnější aberace vzniklé v procesu získávání rezistence hodnotíme rekurentní aberace v genu *ATR*, dále také aberace v sekvenci pro tyrozinovou kinázu kódovanou genem *KDR* s dokumentovanou rolí v regulaci přežívání buňky, proliferace a migrace a dříve již studovanou pro možné využití v cílené terapii (Gille *et al.*, 2001; Tammela *et al.*, 2008). Potenciálně zajímavá je i aberace v genu *MAP3K4*, který je členem signální dráhy *MAPK* a podílí se na procesu meze nchymálně-epiteliální tranzice (Chen *et al.*, 2016; Mobley *et al.*, 2017).

Celoexomová sekvenace a tímto způsobem získaná data byla použita také k analýze celkového množství aberací, ve smyslu celkové mutační zátěže (TMB - tumor mutation burden). U TGN se předpokládá nízká TMB s ohledem na jejich extrémní citlivost ke genotoxickým noxám a potlačení DDR ve prospěch časného spouštění proapoptotických mechanismů. Tyto předpoklady byly potvrzeny i našimi výsledky. Zatímco nízké množství mutací detekovaných u TGN může být výsledkem embryonální DDR vedoucí k apoptóze a neumožňující opravu poškozené DNA, charakter zárodečných buněk a mitotický/meiotický přepínač tvoří silné predispozice pro větší chromozomové přestavby. Charakteristický znak TGN - amplifikace krátkého ramene chromozomu 12 - byl jasně přítomen ve všech analyzovaných vzorcích buněčných linií. Z dalších změn byly některé přítomny ve většině vzorků, zatímco některé byly nalezeny pouze v buňkách rezistentních na CDDP. Dalo by se předpokládat, že CNV mají pravděpodobně vyšší funkční význam než SNV u TGN, pouze naše porozumění a interpretace těchto velmi složitých změn je stále neúplné. Naše výsledky byly v souladu i s některými dalšími GWAS studiemi i dalšími pracemi věnujícími se TGN. Byly tak rekurentně dokumentovány aberace v genech *FOXG1* (Kristiansen *et al.*, 2015), *OPN1LW* (Litchfield *et al.*, 2015), *EOMES* (Alagaratnam *et al.*, 2011; Sheikine *et al.*, 2012), *TFAP2C* (Nielsen *et al.*, 2012), *DMRTA1* (Litchfield *et al.*, 2016, 2017, 2018) a genu *MDM2*, který byl několikanásobně dáván do souvislosti se vznikem rezistence u TGN (García-Velasco *et al.*, 2012; Jacobsen and Honecker, 2015; Bagrodia *et al.*, 2016).

Jako první krok při analýze vzorků pacientů s TGN bylo provedeno stanovení hladiny exprese genu *WT1*. Tento gen je v naší laboratoři studován již dlouho z hlediska jeho významu u leukemických pacientů, jejichž léčbou se naše klinika zabývá. K jeho studiu u TGN nás vedlo několik důvodů. Jedním z nich je charakter TGN, které se v mnohém podobají dětským leukemiím. Jsou to nádory s nízkým počtem somatických mutací, vznikajících v buňkách embryonálního původu zablokovaných ve svém vývoji. U leukemií je tomu podobně, kdy hematopoetické buňky zablokované ve svém vývoji vedou ke vzniku onemocnění (Seth and Singh, 2015). Dalším důvodem je zásadní význam *WT1* v embryogenezi varlat, z čehož se dá usuzovat na jeho možnou roli i v testikulární kancerogenezi. Z našich výsledků vyplývá, že exprese *WT1* je signifikantně snižená u TGN v porovnání s nenádorovou okolní tkání i s kontrolními nenádorovými vzorky. U leukemií byla popsána jak vysoká, tak nízká exprese *WT1*, přičemž snižená exprese *WT1* byla asociována s horší prognózou pacientů (Boublikova *et al.*, 2006). U jiných solidních nádorů je rovněž popisována alterovaná exprese *WT1* – kromě již v úvodu zmíněného Wilmsova tumoru byly změny exprese a mutace *WT1* popsány u WARG syndromu, Denys-Drashova a Frasierova syndromu (Pelletier *et al.*, 1991; Scharnhorst, van der Eb and Jochemsen, 2001; Bandiera *et al.*, 2015). V těchto souvislostech lze usuzovat, že námi detekované snížení exprese *WT1* u TGN představuje dysregulaci tohoto genu související s nádorovým procesem, na jehož rozvoji se může podílet. Snižovaná exprese *WT1* u TGN v porovnání s kontrolami tak naznačuje specifickou roli proteinu WT1 jako tumorsupresoru v této konkrétní tkáni. Na tomto snížení se však může podílet i absence Sertoliho buněk v nádorové tkáni. Tyto buňky exprimují protein WT1 ve vysokých hladinách, jak je patrné z imunohistochemických preparátů. Exprese *WT1* je ale u TGN alterovaná i z jiných hledisek, např. z hlediska expresního vzorce čtyř hlavních izoforem studovaného transkripčního faktoru, kdy byla u TGN oproti zdravé testikulární tkáni prokázána snížená exprese izoforem obsahujících exon 5 a zvýšená exprese izoforem bez exonu 5. Tato změna je pravděpodobně významná z hlediska aktivační funkce WT1 jakožto transkripčního faktoru, jelikož exon 5 kóduje aktivační doménu proteinu WT1. Na druhou stranu se podobně jako u leukemických vzorků (Kramarzova *et al.*, 2012) i zde ukázal poměr izoforem *WT1* s a bez inzertu KTS stabilní jak mezi různými histologickými typy TGN tak i v porovnání mezi nádorovými a nenádorovými vzorky. Inzert KTS je u transkripčního faktoru WT1 nezbytný pro jeho vazbu na DNA. Vzhledem k tomu, že transkripční faktor WT1 má významnou roli při regulaci mnoha buněčných funkcí jako je např. buněčná proliferace, diferenciace, buněčný cyklus či apoptóza, lze předpokládat, že alterované hladiny WT1 a změny v poměru jeho

izoforem významně ovlivní tyto základní buněčné funkce a zasáhnou do procesu maligní transformace u TGN (Wang *et al.*, 1995, 2015, 2019).

Souhrnné vlastnosti genu *WT1*, jak z hlediska jeho snížené celkové exprese u TGN, alterovaného expresního vzorce izoforem i přítomnosti relativně většího počtu mutací detekovaných na úrovni amplikonového sekvenování předpokládají možné využití *WT1* jako prognostického faktoru u TGN, kde pravděpodobně působí podobně jako u Wilmsova tumoru jako tumorsupresorový gen.

Vzhledem k zavedení nových technologií sekvenování nové generace (NGS), které se v posledních letech staly dominantním nástrojem molekulárně-genetických studií, jsme se v rámci této práce zaměřovali na podrobnější analýzu molekulárních aberací přítomných v genomu TGN pomocí této metody. Tento přístup vedl k získání mnoha dat, u kterých jsme museli určit jejich relevantnost z hlediska falešných pozitivit a artefaktů vzniklých technickou manipulací se vzorky během fixace i při přípravě sekvenačních knihoven. Dalším úskalím byla velikost souboru a to hlavně z důvodů celkově nízké incidence TGN a nízké kvality řady vzorků FFPE, z nichž některé se ukázaly být i přes opakované pokusy jako spolehlivě neosekvenovatelné. V interpretaci našich výsledků jsme se snažili zohlednit všechny tyto aspekty.

Amplikonovým sekvenováním jsme takto charakterizovali 27 patientských nádorových vzorků, které jsme vždy porovnali s kontrolním vzorkem daného pacienta. Tyto byly fixovány v bločcích FFPE a byl u nich nejprve proveden pokus o sekvenaci na úrovni celoexomového sekvenování. Tento postup byl neúspěšný, což přisuzujeme zejména jevu degradace DNA, probíhajícímu v takto fixovaných vzorcích, a vedoucímu ke vzniku DNA o nízké kvalitě s fragmenty kratšími než 100 bp, neumožňující tento typ sekvenování. V době sekvenování těchto vzorků teprve docházelo k optimalizaci postupů pro sekvenování vzorků FFPE a nebyly k dispozici takové, které by řešily výskyt těchto arteficiálních výsledků v důsledku fragmentací a častých deaminací v prostředí vytvářené FFPE fixací. Amplikonová sekvenace se posléze ukázala jako vhodná technika a poskytla data o vyhovující kvalitě. Následně jsme pro vyhodnocení získaných dat zvolili dva typy zpracování. V prvním jsme hledali aberace v genech již dříve pokládáných za relevantní pro vznik a progresi TGN a jiných nádorů (*RAS*, *KIT*, *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BRAF*) (Honecker *et al.*, 2009; Feldman *et al.*, 2014a). Tímto přístupem jsme identifikovali mutace v genech *RAS*, které se zdají být rekurentní u TGN, což potvrzují i některé dříve publikované práce. V našem souboru se vyskytly u dvou pacientů, obojí byly mutace považované za patogenní v kodónu 12 genu *KRAS* (Feldman *et al.*, 2014a, 2015; Cutcutache *et al.*, 2015a; Litchfield *et al.*, 2015).

V případě genu *KIT* se naše výsledky lišily od dříve publikovaných, u nichž jsou mutace v tomto genu podstatně častější (v 10-20 % seminomových nádorů) (Cutcutache *et al.*, 2015b; Shen *et al.*, 2018). V našem souboru se nenašla žádná mutace přítomná v sekvenci genu *KIT*, i přes manuální kontrolu daných sekvencí, což je v souladu s recentně publikovanými studii. Mutaci v genu *KIT* tak nepokládáme za častou u pacientů s TGN. Za velmi raritní a související s citlivostí na cispatinu se u TGN považují mutace v genu *TP53*. To se potvrdilo i v našem souboru, mutace v tomto genu nebyla detekována. Zajímavá je i skutečnost, která vyplynula z výsledků imunohistochemického barvení proteinu p53. Ta ukázala nízké hladiny exprese p53 u vzdálených metastáz TGN, což může nasvědčovat roli p53 a defektu jeho normální signalizace při metastatickém rozšiřování nádorových buněk.

V dalším hledání možných aberací podstatných pro vznik TGN jsme pokračovali studiem genu *BRAF*, který kóduje serin threoninovou kinázu, fungující jako protoonkogen u mnoha nádorů (Sithanandam *et al.*, 1990; Millington, 2013; Loo *et al.*, 2018). První publikace o mutaci *BRAF* naznačovaly, že spolu s mikrosatelitovou nestabilitou (MSI) souvisí mutace v tomto genu i se vznikem CDDP rezistence (Honecker *et al.*, 2009). Analýzou dat amplikonového sekvenování jsme prokázali poměrně častou přítomnost mutací v sekvenci genu *BRAF* u 27 % osekvenovaných pacientů, ale specifická a za patogenní pro tento gen pokládá mutace V600E nebyla v našem souboru nalezena. Dále jsme studovali přítomnost mutace *BRAF* V600E cíleně pomocí komerčního kitu u další a zároveň větší kohorty pacientů. Tato mutace byla nalezena a potvrzena následným Sangerovým sekvenováním u 2 z 210 vyšetřených patientských vzorků. Takto nízká frekvence mutace V600E nevypovídá o možné závažnosti pro vznik a vývoj TGN, což je v souladu i s poznatky dalších studií (Feldman *et al.*, 2014b; Pedersen *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2019). Ani u jednoho z pacientů s danou mutací nedošlo k relapsu onemocnění.

V další části našich analýz jsme hodnotili celé spektrum aberací nacházejících se v rozsahu provedeného amplikonového nebo celoexomového sekvenování. Zde se jako nový a zajímavý ukázal gen kódující histon methyltransferázu *NSDI* mutovaný u 33 % pacientů, což společně s přítomností mutace u 11 % pacientů v genu *SETD2* kódujícího další histon methyltransferázu svědčí o možné roli histonových modifikací při vzniku TGN. Gen *NSDI* s nejvyšším počtem aberací v rámci sekvenačních dat amplikonového i exomového sekvenování byl identifikován jako onkogen nebo tumor supresor v závislosti na buněčném kontextu. Jeho aberantní stav exprese nebo mutace byly popsány v několika pracích (Vougiouklakis *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2017). Tento gen se fyziologicky uplatňuje v časném prenatalním vývoji a jeho aberace hrají roli při vzniku Sotosova syndromu, který zahrnuje

poruchy růstu a neurologické abnormality, někdy také kryptorchidismus a maligní nádory. Gen *SETD2* je důležitým partnerem pro gen *NSD1*. Je také známo, že tento gen působí jako tumor supresor (Al Sarakbi *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Manley *et al.*, 2017) a klíčový regulátor stability genomu (Pfister *et al.*, 2014). Stejně jako předchozí gen nebyl popsán ve vztahu k TGN, ale je známo, že je zapojen do spermatogeneze a jeho aberace mohou souviset s mužskou neplodností (Zuo *et al.*, 2018). Oba nálezy jsou v souladu s jinými studii provedenými na různých typech nádorů (Mar *et al.*, 2017; Heeke *et al.*, 2018) a podporují roli epigenetických mechanismů v patogenezi TGN. Mutace genu *FANCA* byly přítomny u 10 % pacientů. Zatímco je tento gen dobře známý pro svou funkci v post-replikační opravě DNA a udržování stability chromozomů, jeho vysoké hladiny exprese byly také dokumentovány v pachytenových (myších) spermatocytech a předpokládá se jeho role při udržování stavu reprodukčních zárodečných buněk a při meiotické rekombinaci (Wong *et al.*, 2003).

Celkově se po konečné fázi filtrace a interpretace našich sekvenačních výstupů ukázalo, že nejvíce aberovanými geny jsou ty podílející se na procesech remodelace chromatinu a zapojených do oprav DNA pomocí DDR dráhy (DNA damage response). Svědčí o tom i již zmíněné aberace v genech *FANCA* a dále také aberace genu *ATRX*, přičemž varianty v tomto genu se nacházely u pacientů osekvenovaných celoexomovým i aplikonovým sekvenováním a byly detekovány také při analýze buněčných linií s rezistencí na cisplatinu. Gen *ATRX* kóduje protein α -thalassemia mentální retardace X-vázaný, je členem superrodiny SWI/SNF zapojené do remodelace chromatinu, regulující různé buněčné procesy jako je replikační stresová reakce, transkripce nebo mitotická rekombinace (Baker, Allis and Wang, 2008). Ukázalo se, že hraje klíčovou roli v sexuální diferenciaci. Aberace v sekvenci *ATRX* nebo změny jeho exprese byly nalezeny u různých druhů malignit, včetně gliomu, neuroblastomu, osteosarkomu, kolorektálního karcinomu nebo plicního karcinomu (Heeke *et al.*, 2018). Dosud nebyly aberace tohoto genu dávány do souvislosti s TGN, nicméně tzv. syndrom *ATRX* způsobený mutacemi v *ATRX* zahrnuje kromě thalassémie a mentální retardace také gonadální dysgenezi různého stupně, v extrémních případech dokonce reverzi pohlaví u mužů (male to female sex reversal), což podporuje jeho pravděpodobnou funkční roli ve vývoji TGN (De La Fuente, Baumann and Viveiros, 2011).

Transkriptomovým sekvenováním a následnou analýzou byla dokumentována změna v expresi u několika transkripčních faktorů, jejichž role v tumorogenezi byla již dříve popsána (*PAX5*, *DAB2*, *SPINT2*, *TFDPI*) (Adams *et al.*, 1992; Mok *et al.*, 1998; Thomas-Tikhonenko and Cozma, 2008; Melchor *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019), též i u již dříve

zmíněného *NSDI*. Význam pro vznik TGN mohou mít také nalezené změny v expresi dalších genů regulujících buněčnou proliferaci, signalizaci, metabolismus, adhezi a také genů regulujících apoptózu a zánětlivou reakci. Samozřejmě si tyto naše výsledky žádají další studium pro ověření jejich skutečného vlivu na vznik a vývoj TGN, ale zde z našeho hlediska utvářejí celkový obraz TGN, na jejichž vzniku se potvrzuje vliv mnoha faktorů, jak genetických, tak i faktorů zevního prostředí viz literární přehled.

6. Závěr

Tato práce pomocí širokého spektra metod moderní molekulární biologie včetně v dnešní době standardně využívané a technologicky nejvyspělejší metody masivně-paralelního sekvenování poukazuje na několik dosud ne zcela známých vlastností TGN. Jedním z hlavních problémů u TGN je vývoj rezistence na cisplatinu, která je podle našich výsledků spojena se zvyšováním množství genetických aberací na úrovni SNV/TMB i CNV. Některé z těchto aberací mohou představovat potenciální prvotní mutace vedoucí ke vzniku malignity, zatímco většina z nich je výsledkem pokračující maligní transformace a klonálního vývoje z velmi jedinečného typu nádoru se specifickými embryonálními a zárodečnými buňkami na maligní solidní nádor s obecnějšími charakteristikami a vyšší genomickou nestabilitou. Rezistence na cisplatinu u TGN by pravděpodobně měla být chápána jako ztráta vysoké citlivosti na dané cytostatikum. Získaná rezistence je spojena se sníženou apoptotickou reakcí, sníženou proliferací a změnami v kontrole buněčného cyklu s tendencí k jeho pozastavení, což umožňuje opravu poškození vyvolaného chemoterapií. Bylo identifikováno několik genů, které mají potenciální vliv na vývoj rezistence na cisplatinu - některé z nich byly dříve uvedeny ve vztahu k citlivosti TGN (např. *DMRTA1*) nebo rezistenci TGN (*MDM2*). Gen *ATRX*, nově reportovaný v naší práci, představuje kandidáta na funkční roli v etiopatologii rezistence TGN na cisplatinu. Amplikonovým sekvenováním vzorků TGN pacientů jsme přispěli k nalezení potenciálních genů souvisejících s vznikem TGN - *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *BRAF*, *WT1*, *TP53*, *MDM2* a *ATM*. Námi nově studovaný gen *WT1* se jeví jako další nadějný kandidát s významem pro vývoj TGN. Jedná se o transkripční faktor nezbytný pro vývoj a funkci varlat, jehož role u TGN dosud nebyla popsána. Kvantifikací celkové exprese *WT1* a jeho hlavních izoform u TGN pacientů jsme prokázali významné snížení exprese *WT1* s výrazným posunem k izoformám postrádajícím exon 5 v nádorových vzorcích, společně s relativně vysokým výskytem somatických mutací *WT1*. Tyto výsledky nás vedou k pohledu na *WT1* jako na nový faktor zapojený do patogeneze TGN, pravděpodobně jako tumor supresorový gen. Patogenní mutace *BRAF* V600E byla naopak identifikována pouze u 1 % pacientů, což nesvědčí pro její roli v patogenezi TGN. Dále byla imunohistochemicky hodnocena exprese proteinu p53, ukazující významné snížení exprese v metastázách ve srovnání s původními nádory, což může indikovat roli p53 v metastatickém šíření TGN. V této práci byla problematika vzniku i rezistence TGN na léčbu analyzována z několika různých hledisek, jak na experimentální úrovni, tak i na úrovni zkoumání patientských vzorků. K tomuto účelu byly použity nejmodernější molekulárně-biologické techniky v podobě sekvenování nové generace na úrovni amplikonu, exomu i

transkriptomu s ohledem na vlastnosti dostupného biologického materiálu. Současně bylo do studia TGN zapojeno i několik klasických metod analýzy buněčných vlastností linií TGN za použití průtokové cytometrie. Hladiny exprese genů byly analyzovány pomocí qPCR, mutace ve vybraných genech byly zkoumány za použití komerčních systémů i Sangerovým sekvenováním. Cílem tohoto přístupu bylo získání komplexního obrazu, který by pomohl objasnit unikátní vlastnosti TGN a přispěl k nalezení kandidátních genů, jež by mohly sloužit jako nové prognostické faktory nebo cíle pro biologickou léčbu a tak umožnit větší personalizaci terapie u pacientů s těmito nádory v budoucnu.

7. Seznam použitých zkratk

6FAM	6-carboxyfluorescein
ABL	Abelson gene
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ATCC	American Type Culture Collection
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
CD30	cluster of differentiation 30
CDDP	cis-diamminedichloridoplatinum
CO ₂	oxid uhličitý
CS	clinical stage (klinické stadium)
CR	celková remise
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	dna damage response
DF	disease-free (bez známek nemoci)
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidy
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
FBS	fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FUP	follow up
GCNIS	germ cell neoplasia in situ
GWAS	genome-wide association study
chr	chromozom
CHT	chemoterapie
IHC	immunohistochemie
i	izochromozom
ID	identifikace
KTS	Lysin, Threonin, Serin
log	logaritmus

M13	bakteriofág M13
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
m	mili
M	molar
Mbp	mega base pairs
min	minuta
miRNA	mikroRNA
MMLV	Moloney murine leukemia virus
MSI	microsatellite instability
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
mRNA	messenger RNA
miRNA	micro RNA
NCN	normalised copy number
NGS	next generation sequencing
NS	ne seminomy
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD	prograduující onemocnění
PGB	primordiální germinální buňky
Phred	Phil's Read Editor
PK	periferní krev
poz	pozice
pt	pacient
R	relaps
ref	reference
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	rotation per minute (otáček za minutu)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rs	RefSNPs
RT	reverzní transkripce
Rvs	reverse
S	seminomy
s	sekunda

siRNA	small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SNV	single nucleotide variant
SRY	sex determining region Y
TAMRA	tetramethylrhodamine
TGN	testiculární germální nádor
TMB	tumor mutation burden
USA	United States of America
var	varianta
var frekv	frekvence varianty
var typ	typ varianty
WAGR	Wilms tumour, Aniridia, Genitourinary anomalies, mental Retardation
WES	whole exom sequencing
WT1	Wilms' tumor gene 1

8. Reference

- Adams, B. *et al.* (1992) 'Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis.', *Genes & development*, 6(9), pp. 1589–607. doi: 10.1101/gad.6.9.1589.
- Ahmad, F. *et al.* (2019) 'Aberrant epigenetic inactivation of RASSF1A and MGMT gene and genetic mutations of KRAS, cKIT and BRAF in Indian testicular germ cell tumours', *Cancer Genetics*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.cancergen.2019.10.002.
- Alagaratnam, S. *et al.* (2011) 'The testicular germ cell tumour transcriptome', *International Journal of Andrology*, 34(4pt2), pp. e133–e151. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01169.x.
- Albany, C. *et al.* (2018) 'Treatment of CD30-Expressing Germ Cell Tumors and Sex Cord Stromal Tumors with Brentuximab Vedotin: Identification and Report of Seven Cases.', *The oncologist*, 23(3), pp. 316–323. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0544.
- Albers, P. *et al.* (2015) 'Guidelines on Testicular Cancer: 2015 Update', *European Urology*. Elsevier B.V., 68(6), pp. 1054–1068. doi: 10.1016/j.eururo.2015.07.044.
- Algar, E. *et al.* (1997) 'Mutation analysis of the WT1 gene in sporadic childhood leukaemia.', *Leukemia*, 11(1), pp. 110–3. doi: 10.1038/sj.leu.2400521.
- Ariyaratana, S. and Loeb, D. M. (2007) 'The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9(14), pp. 1–17. doi: 10.1017/S1462399407000336.
- Ashman, L. K. (1999) 'The biology of stem cell factor and its receptor C-kit.', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31(10), pp. 1037–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10582338> (Accessed: 12 July 2018).
- Azzopardi, J. G., Mostofi, F. K. and Theiss, E. A. (1961) 'Lesions of testes observed in certain patients with widespread choriocarcinoma and related tumors. The significance and genesis of hematoxylin-staining bodies in the human testis.', *The American journal of pathology*, 38, pp. 207–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13685483> (Accessed: 7 November 2019).
- Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data* (no date). Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (Accessed: 15 January 2020).
- Bagrodia, A. *et al.* (2016) 'Genetic Determinants of Cisplatin Resistance in Patients With Advanced

Germ Cell Tumors', *Journal of Clinical Oncology*, 34(33), pp. 4000–4007. doi: 10.1200/JCO.2016.68.7798.

Bahrami, A., Ro, J. Y. and Ayala, A. G. (2007) 'An overview of testicular germ cell tumors.', *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(8), pp. 1267–80. doi: 10.1043/1543-2165(2007)131[1267:AOTGTC]2.0.CO;2.

Baird, P. N. and Simmons, P. J. (1997) 'Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis', *Experimental Hematology*, 25(4), pp. 312–320.

Baker, L. A., Allis, C. D. and Wang, G. G. (2008) 'PHD fingers in human diseases: Disorders arising from misinterpreting epigenetic marks', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 647(1–2), pp. 3–12. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.004.

Baltaci, S. *et al.* (2001) 'P53, bcl-2 and bax immunoreactivity as predictors of response and outcome after chemotherapy for metastatic germ cell testicular tumours', *BJU International*, 87(7), pp. 661–666. doi: 10.1046/j.1464-410X.2001.02151.x.

Bandiera, R. *et al.* (2015) 'Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 145–155. doi: 10.1016/j.mce.2015.01.009.

Barbaux, S. *et al.* (1997) 'Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 17(4), pp. 467–470. doi: 10.1038/ng1297-467.

Biermann, K. *et al.* (2007) 'c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma.', *The Journal of pathology*, 213(3), pp. 311–8. doi: 10.1002/path.2225.

Bosl, G. J. and Motzer, R. J. (1997) 'Testicular Germ-Cell Cancer', *New England Journal of Medicine*, 337(4), pp. 242–254. doi: 10.1056/NEJM199707243370406.

Boublikova, L. *et al.* (2006) 'Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: A wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 20(2), pp. 254–263. doi: 10.1038/sj.leu.2404047.

Boublikova, L. *et al.* (2014) 'Molecular biology of testicular germ cell tumors: unique features awaiting clinical application.', *Critical reviews in oncology/hematology*, 89(3), pp. 366–85. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.10.001.

- Bowles, J. and Koopman, P. (2001) 'New clues to the puzzle of mammalian sex determination.', *Genome biology*, 2(9), p. REVIEWS1025. doi: 10.1186/gb-2001-2-9-reviews1025.
- Brabrand, S. *et al.* (2015) 'Exome sequencing of bilateral testicular germ cell tumors suggests independent development lineages.', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 17(2), pp. 167–74. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.005.
- Carapeti, M., Goldman, J. M. and Cross, N. C. (1997) 'Dominant-negative mutations of the Wilms' tumour predisposing gene (WT1) are infrequent in CML blast crisis and de novo acute leukaemia.', *European journal of haematology*, 58(5), pp. 346–9. doi: 10.1111/j.1600-0609.1997.tb01681.x.
- Charlton, J. and Pritchard-Jones, K. (2016) 'WT1 Mutation in Childhood Cancer.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1467, pp. 1–14. doi: 10.1007/978-1-4939-4023-3_1.
- Chen, T. *et al.* (2016) 'Hotspot mutations delineating diverse mutational signatures and biological utilities across cancer types', *BMC Genomics*. BioMed Central, 17(S2), p. 394. doi: 10.1186/s12864-016-2727-x.
- Chresta, C. M., Masters, J. R. and Hickman, J. A. (1996) 'Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio.', *Cancer research*, 56(8), pp. 1834–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620501> (Accessed: 22 January 2020).
- Coffey, J. *et al.* (2008) 'Somatic KIT mutations occur predominantly in seminoma germ cell tumors and are not predictive of bilateral disease: report of 220 tumors and review of literature.', *Genes, chromosomes & cancer*, 47(1), pp. 34–42. doi: 10.1002/gcc.20503.
- Cutcutache, I. *et al.* (2015a) 'Exome-wide Sequencing Shows Low Mutation Rates and Identifies Novel Mutated Genes in Seminomas.', *European urology*, 68(1), pp. 77–83. doi: 10.1016/j.eururo.2014.12.040.
- Cutcutache, I. *et al.* (2015b) 'Exome-wide Sequencing Shows Low Mutation Rates and Identifies Novel Mutated Genes in Seminomas.', *European urology*, 68(1), pp. 77–83. doi: 10.1016/j.eururo.2014.12.040.
- Duale, N. *et al.* (2007) 'Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles', *Molecular Cancer*, 6. doi: 10.1186/1476-4598-6-53.
- Ekbom, A. *et al.* (2003) 'Age at immigration and duration of stay in relation to risk for testicular cancer among Finnish immigrants in Sweden.', *Journal of the National Cancer Institute*, 95(16), pp.

1238–40. doi: 10.1093/jnci/djg012.

English, M. A. and Licht, J. D. (1999) ‘Tumor-associated WT1 missense mutants indicate that transcriptional activation by WT1 is critical for growth control.’, *The Journal of biological chemistry*, 274(19), pp. 13258–63. doi: 10.1074/jbc.274.19.13258.

Feldman, D. R. *et al.* (2014a) ‘Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors.’, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(14), pp. 3712–20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2868.

Feldman, D. R. *et al.* (2014b) ‘Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors.’, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(14), pp. 3712–20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2868.

Feldman, D. R. *et al.* (2015) ‘Association of genomic alterations with cisplatin resistance (cisR) in advanced germ cell tumors (aGCT).’, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology (ASCO), 33(15_suppl), pp. 4510–4510. doi: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.4510.

Fenske, A. E. *et al.* (2012) ‘Cisplatin resistance induced in germ cell tumour cells is due to reduced susceptibility towards cell death but not to altered DNA damage induction or repair’, *Cancer Letters*, 324(2), pp. 171–178. doi: 10.1016/j.canlet.2012.05.009.

Ferlay, J. *et al.* (2010) ‘Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008’, *International Journal of Cancer*, 127(12), pp. 2893–2917. doi: 10.1002/ijc.25516.

Fosså, S. D. *et al.* (2005) ‘Risk of contralateral testicular cancer: a population-based study of 29,515 U.S. men.’, *Journal of the National Cancer Institute*, 97(14), pp. 1056–66. doi: 10.1093/jnci/dji185.

Gaidzik, V. I. *et al.* (2009) ‘Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group.’, *Blood*, 113(19), pp. 4505–11. doi: 10.1182/blood-2008-10-183392.

García-Velasco, A. *et al.* (2012) ‘Biological markers of cisplatin resistance in advanced testicular germ cell tumours’, *Clinical and Translational Oncology*, 14(6), pp. 452–457. doi: 10.1007/s12094-012-0823-1.

Gaskell, T. L. *et al.* (2004) ‘Immunohistochemical Profiling of Germ Cells Within the Human Fetal Testis: Identification of Three Subpopulations’, *Biology of Reproduction*. Oxford University Press

(OUP), 71(6), pp. 2012–2021. doi: 10.1095/biolreprod.104.028381.

Ghazarian, A. A. *et al.* (2015) ‘Recent trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States’, *Andrology*, 3(1), pp. 13–18. doi: 10.1111/andr.288.

Giannandrea, F. and Fargnoli, S. (2017a) ‘Environmental Factors Affecting Growth and Occurrence of Testicular Cancer in Childhood: An Overview of the Current Epidemiological Evidence.’, *Children (Basel, Switzerland)*, 4(1). doi: 10.3390/children4010001.

Giannandrea, F. and Fargnoli, S. (2017b) ‘Environmental Factors Affecting Growth and Occurrence of Testicular Cancer in Childhood: An Overview of the Current Epidemiological Evidence’, *Children*. MDPI AG, 4(1), p. 1. doi: 10.3390/children4010001.

Gilbert, D., Rapley, E. and Shipley, J. (2011) ‘Testicular germ cell tumours: Predisposition genes and the male germ cell niche’, *Nature Reviews Cancer*, pp. 278–288. doi: 10.1038/nrc3021.

Gille, H. *et al.* (2001) ‘Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants.’, *The Journal of biological chemistry*, 276(5), pp. 3222–30. doi: 10.1074/jbc.M002016200.

Gurney, J. K. *et al.* (2019) ‘International Trends in the Incidence of Testicular Cancer: Lessons from 35 Years and 41 Countries’, *European Urology*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.eururo.2019.07.002.

Hammes, A. *et al.* (2001) ‘Two splice variants of the wilms’ tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation’, *Cell*. Cell Press, 106(3), pp. 319–329. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00453-6.

Hastie, N. D. (2017) ‘Wilms’ tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease’, *Development (Cambridge)*. Company of Biologists Ltd, 144(16), pp. 2862–2872. doi: 10.1242/dev.153163.

Heeke, A. L. *et al.* (2018) ‘Prevalence of Homologous Recombination–Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types’, *JCO Precision Oncology*, 2018(2), pp. 1–13. doi: 10.1200/PO.17.00286.

Hemminki, K and Li, X. (2002) ‘Cancer risks in Nordic immigrants and their offspring in Sweden.’, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 38(18), pp. 2428–34. doi: 10.1016/s0959-8049(02)00496-3.

Hemminki, Kari and Li, X. (2002) ‘Cancer risks in second-generation immigrants to Sweden’, *International Journal of Cancer*, 99(2), pp. 229–237. doi: 10.1002/ijc.10323.

- Hoei-Hansen, C. E. *et al.* (2004) 'Identification of genes differentially expressed in testes containing carcinoma in situ', *Molecular Human Reproduction*, 10(6), pp. 423–431. doi: 10.1093/molehr/gah059.
- Hoei-Hansen, Christina E. *et al.* (2004) 'Transcription factor AP-2 γ is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors', *Clinical Cancer Research*, 10(24), pp. 8521–8530. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1285.
- Holmes, L. *et al.* (2008) 'Testicular cancer incidence trends in the USA (1975–2004): plateau or shifting racial paradigm?', *Public Health*, 122(9), pp. 862–872. doi: 10.1016/j.puhe.2007.10.010.
- Honecker, F. *et al.* (2009) 'Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors', *Journal of Clinical Oncology*, 27(13), pp. 2129–2136. doi: 10.1200/JCO.2008.18.8623.
- Hosen, N. *et al.* (2002) 'Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells.', *British journal of haematology*, 116(2), pp. 409–20. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03261.x.
- Houldsworth, J. *et al.* (1997) 'Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis.', *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8(3), pp. 293–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9056671> (Accessed: 12 July 2018).
- Jacobsen, C. and Honecker, F. (2015) 'Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms', *Andrology*, 3(1), pp. 111–121. doi: 10.1111/andr.299.
- Jain, A. *et al.* (2013) 'Phase II clinical trial of oxaliplatin and Bevacizumab in refractory germ cell tumors', *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. Lippincott Williams and Wilkins, 37(5), pp. 450–453. doi: 10.1097/COC.0b013e31827de90d.
- Jedema, I. *et al.* (2003) 'Recruitment of leukemic cells from G0 phase of the cell cycle by interferons results in conversion of resistance to daunorubicin.', *Leukemia*, 17(10), pp. 2049–51. doi: 10.1038/sj.leu.2403085.
- Jedema, I. *et al.* (2004) 'Acute myeloid leukemia cells in G0 phase of the cell cycle that are unresponsive to conventional chemotherapy are sensitive to treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/diphtheria toxin fusion proteins', *Experimental Hematology*, 32(2), pp. 188–194. doi: 10.1016/j.exphem.2003.11.005.
- King-Underwood, L., Renshaw, J. and Pritchard-Jones, K. (1996) 'Mutations in the Wilms' tumor

gene WT1 in leukemias', *Blood*, 87(6), pp. 2171–2179. doi: 10.1182/blood.v87.6.2171.bloodjournal8762171.

Klamt, B. *et al.* (1998) 'Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms.', *Human molecular genetics*, 7(4), pp. 709–14. doi: 10.1093/hmg/7.4.709.

Knudson, A. G. and Strong, L. C. (1972) 'Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney.', *Journal of the National Cancer Institute*, 48(2), pp. 313–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4347033> (Accessed: 9 January 2020).

Koster, R. *et al.* (2010) 'Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer.', *The Journal of clinical investigation*, 120(10), pp. 3594–605. doi: 10.1172/JCI41939.

Kramarzova, K. *et al.* (2012) 'Real-time PCR quantification of major Wilms tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences', *Leukemia*, 26(9), pp. 2086–2095. doi: 10.1038/leu.2012.76.

Krauth, M.-T. *et al.* (2015) 'WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups.', *Leukemia*, 29(3), pp. 660–7. doi: 10.1038/leu.2014.243.

Krege, S. *et al.* (2008a) 'European Consensus Conference on Diagnosis and Treatment of Germ Cell Cancer: A Report of the Second Meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): Part I', *European Urology*, pp. 478–496. doi: 10.1016/j.eururo.2007.12.024.

Krege, S. *et al.* (2008b) 'European Consensus Conference on Diagnosis and Treatment of Germ Cell Cancer: A Report of the Second Meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG): Part II', *European Urology*, pp. 497–513. doi: 10.1016/j.eururo.2007.12.025.

Kreidberg, J. A. *et al.* (1993) 'WT-1 is required for early kidney development', *Cell*, 74(4), pp. 679–691. doi: 10.1016/0092-8674(93)90515-R.

Kristiansen, W. *et al.* (2015) 'Two new loci and gene sets related to sex determination and cancer progression are associated with susceptibility to testicular germ cell tumor.', *Human molecular genetics*, 24(14), pp. 4138–46. doi: 10.1093/hmg/ddv129.

De La Fuente, R., Baumann, C. and Viveiros, M. M. (2011) 'Role of ATRX in chromatin structure and function: implications for chromosome instability and human disease.', *Reproduction*

- (Cambridge, England), 142(2), pp. 221–34. doi: 10.1530/REP-10-0380.
- Li, H. and Durbin, R. (2010) ‘Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform.’, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(5), pp. 589–95. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698.
- Li, J. *et al.* (2016) ‘SETD2: an epigenetic modifier with tumor suppressor functionality’, *Oncotarget*, 7(31), pp. 50719–50734. doi: 10.18632/oncotarget.9368.
- Li, X. J., Ren, R. J. and Tang, J. H. (2014) ‘MicroRNA-34a: A potential therapeutic target in human cancer’, *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/cddis.2014.270.
- Litchfield, K. *et al.* (2015) ‘Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours’, *Nature Communications*, 6(1), p. 5973. doi: 10.1038/ncomms6973.
- Litchfield, K. *et al.* (2016) ‘The genomic landscape of testicular germ cell tumours: from susceptibility to treatment’, *Nature Reviews Urology*, 13(7), pp. 409–419. doi: 10.1038/nrurol.2016.107.
- Litchfield, K. *et al.* (2017) ‘Identification of 19 new risk loci and potential regulatory mechanisms influencing susceptibility to testicular germ cell tumor’, *Nature Genetics*, 49(7), pp. 1133–1140. doi: 10.1038/ng.3896.
- Litchfield, K. *et al.* (2018) ‘Large-scale Sequencing of Testicular Germ Cell Tumour (TGCT) Cases Excludes Major TGCT Predisposition Gene’, *European Urology*, 73(6), pp. 828–831. doi: 10.1016/j.eururo.2018.01.021.
- Little, M. *et al.* (1995) ‘DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by denys-drash syndrome WT1 point mutations’, *Human Molecular Genetics*, 4(3), pp. 351–358. doi: 10.1093/hmg/4.3.351.
- Little, M. and Wells, C. (1997) ‘A clinical overview of WT1 gene mutations.’, *Human mutation*, 9(3), pp. 209–25. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:3<209::AID-HUMU2>3.0.CO;2-2.
- Loo, E. *et al.* (2018) ‘BRAF V600E Mutation Across Multiple Tumor Types: Correlation between DNA-based Sequencing and Mutation-specific Immunohistochemistry’, *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. Lippincott Williams and Wilkins, 26(10), pp. 709–713. doi: 10.1097/PAI.0000000000000516.
- Looijenga, L. H. J. *et al.* (2011) ‘Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance.’, *International journal of andrology*, 34(4 Pt 2), pp. e234-51. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01157.x.

- Manley, B. J. *et al.* (2017) 'Integration of Recurrent Somatic Mutations with Clinical Outcomes: A Pooled Analysis of 1049 Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma', *European Urology Focus*, 3(4–5), pp. 421–427. doi: 10.1016/j.euf.2016.06.015.
- Mar, B. G. *et al.* (2017) 'SETD2 alterations impair DNA damage recognition and lead to resistance to chemotherapy in leukemia.', *Blood*, 130(24), pp. 2631–2641. doi: 10.1182/blood-2017-03-775569.
- Mark, G. J. and Hedinger, C. (1965) 'Changes in remaining tumor-free testicular tissue in cases of seminoma and teratoma', *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*. Springer-Verlag, 340(1), pp. 84–92. doi: 10.1007/BF00960253.
- McIntyre, A. *et al.* (2008) 'Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults', *Genes Chromosomes and Cancer*, pp. 547–557. doi: 10.1002/gcc.20562.
- Melchor, L. *et al.* (2009) 'Comprehensive characterization of the DNA amplification at 13q34 in human breast cancer reveals TFDP1 and CUL4A as likely candidate target genes', *Breast Cancer Research*, 11(6). doi: 10.1186/bcr2456.
- Millington, G. W. M. (2013) 'Mutations of the BRAF gene in human cancer, by Davies et al. (Nature 2002; 417: 949-54)', *Clinical and Experimental Dermatology*, pp. 222–223. doi: 10.1111/ced.12015.
- Miyagawa, K. *et al.* (1999) 'Mutations of the WT1 gene in childhood nonlymphoid hematological malignancies.', *Genes, chromosomes & cancer*, 25(2), pp. 176–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338002> (Accessed: 17 January 2020).
- Mobley, R. J. *et al.* (2017) 'MAP3K4 Controls the Chromatin Modifier HDAC6 during Trophoblast Stem Cell Epithelial-to-Mesenchymal Transition', *Cell Reports*, 18(10), pp. 2387–2400. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.030.
- Mok, S. C. *et al.* (1998) 'DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer.', *Oncogene*, 16(18), pp. 2381–7. doi: 10.1038/sj.onc.1201769.
- Montgomery, S. M. *et al.* (2005) 'Germ-cell testicular cancer in offspring of finnish immigrants to Sweden', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14(1), pp. 280–282.
- Natoli, T. A. *et al.* (2002) 'A Mammal-Specific Exon of WT1 Is Not Required for Development or Fertility', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 22(12), pp. 4433–4438. doi: 10.1128/mcb.22.12.4433-4438.2002.
- Necchi, A. *et al.* (2016) 'Brentuximab Vedotin in CD30-Expressing Germ Cell Tumors After Chemotherapy Failure.', *Clinical genitourinary cancer*, 14(4), pp. 261-264.e4. doi:

10.1016/j.clgc.2016.03.020.

Necchi, A. *et al.* (2017) ‘Pazopanib in advanced germ cell tumors after chemotherapy failure: Results of the open-label, single-arm, phase 2 Pazotest trial’, *Annals of Oncology*. Oxford University Press, 28(6), pp. 1346–1351. doi: 10.1093/annonc/mdx124.

Nielsen, J. E. *et al.* (2012) ‘A novel double staining strategy for improved detection of testicular carcinoma in situ cells in human semen samples’, *Andrologia*, 44(2), pp. 78–85. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01108.x.

Oechsle, K. *et al.* (2011a) ‘Preclinical and clinical activity of sunitinib in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ cell tumors: a Canadian Urologic Oncology Group/German Testicular Cancer Study Group cooperative study’, *Annals of Oncology*, 22(12), pp. 2654–2660. doi: 10.1093/annonc/mdr026.

Oechsle, K. *et al.* (2011b) ‘Preclinical and clinical activity of sunitinib in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ cell tumors: A Canadian Urologic Oncology Group/German Testicular Cancer Study Group cooperative study’, *Annals of Oncology*, 22(12), pp. 2654–2660. doi: 10.1093/annonc/mdr026.

Oing, C. *et al.* (2018) ‘5-Azacytidine Exerts Prolonged Pro-Apoptotic Effects and Overcomes Cisplatin-Resistance in Non-Seminomatous Germ Cell Tumor Cells.’, *International journal of molecular sciences*, 20(1), p. 21. doi: 10.3390/ijms20010021.

Oing, C. *et al.* (2019) ‘Treatment of refractory germ-cell tumours with single-agent cabazitaxel: a German Testicular Cancer Study Group case series’, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Springer. doi: 10.1007/s00432-019-03071-2.

Okonechnikov, K., Conesa, A. and García-Alcalde, F. (2016) ‘Qualimap 2: Advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data’, *Bioinformatics*. Oxford University Press, 32(2), pp. 292–294. doi: 10.1093/bioinformatics/btv566.

Oldenburg, J. *et al.* (2015) ‘Personalizing, not patronizing: The case for patient autonomy by unbiased presentation of management options in stage I testicular cancer’, *Annals of Oncology*. Oxford University Press, pp. 833–838. doi: 10.1093/annonc/mdu514.

Oliver, R. T. (1997) ‘Testis cancer.’, *Current opinion in oncology*, 9(3), pp. 287–94. doi: 10.1097/00001622-199709030-00012.

Oosterhuis, J. W. and Looijenga, L. H. J. (2003) ‘Current views on the pathogenesis of testicular germ

- cell tumours and perspectives for future research: Highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ and Cancer of the Testis', in *APMIS*, pp. 280–289. doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.1110131.x.
- Park, J. S. *et al.* (2018) 'Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality', *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins, 97(37). doi: 10.1097/MD.00000000000012390.
- Parkin, D. M. *et al.* (no date) 'Global cancer statistics, 2002.', *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(2), pp. 74–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078> (Accessed: 12 July 2018).
- Parkin, D. M. and Iscovich, J. (1997) 'Risk of cancer in migrants and their descendants in Israel: II. Carcinomas and germ-cell tumours.', *International journal of cancer*, 70(6), pp. 654–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096645> (Accessed: 12 July 2018).
- Paschka, P. *et al.* (2008) 'Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(28), pp. 4595–602. doi: 10.1200/JCO.2007.15.2058.
- Pedersen, L. H. *et al.* (2016) 'Differences in global DNA methylation of testicular seminoma are not associated with changes in histone modifications, clinical prognosis, BRAF mutations or gene expression', *Cancer Genetics*. Elsevier Inc., 209(11), pp. 506–514. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.10.003.
- Pedersini, R. *et al.* (2007) 'Complete response after treatment with imatinib in pretreated disseminated testicular seminoma with overexpression of c-KIT', *Lancet Oncology*, 8(11), pp. 1039–1040. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70344-3.
- Pelletier, J. *et al.* (1991) 'WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour', *Nature*, 353(6343), pp. 431–434. doi: 10.1038/353431a0.
- Pfister, S. X. *et al.* (2014) 'SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability.', *Cell reports*. Elsevier, 7(6), pp. 2006–18. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.026.
- Pritchard-Jones, K., Renshaw, J. and King-Underwood, L. (1994) 'The Wilms tumour (WT1) gene is mutated in a secondary leukaemia in a WAGR patient.', *Human molecular genetics*, 3(9), pp. 1633–7. doi: 10.1093/hmg/3.9.1633.

Rajpert-De Meyts, E. (no date) ‘Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects.’, *Human reproduction update*, 12(3), pp. 303–23. doi: 10.1093/humupd/dmk006.

Rapley, E. A. *et al.* (2004) ‘Somatic mutations of KIT in familial testicular germ cell tumours.’, *British journal of cancer*, 90(12), pp. 2397–401. doi: 10.1038/sj.bjc.6601880.

Renneville, A. *et al.* (2009) ‘Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults with acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association’, *Cancer*, 115(16), pp. 3719–3727. doi: 10.1002/cncr.24442.

Reuter, V. E. (2005) ‘Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors.’, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 18 Suppl 2, pp. S51-60. doi: 10.1038/modpathol.3800309.

Riccardi, V. M. *et al.* (1978) ‘Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms’ tumor association: 11p interstitial deletion.’, *Pediatrics*, 61(4), pp. 604–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/208044> (Accessed: 9 January 2020).

Richard, D. J. *et al.* (2001) ‘Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1’, *Genes and Development*, 15(3), pp. 328–339. doi: 10.1101/gad.185901.

Ritz, C. *et al.* (2015) ‘Dose-Response Analysis Using R.’, *PloS one*. Edited by Y. Xia, 10(12), p. e0146021. doi: 10.1371/journal.pone.0146021.

Robinson, J. T. *et al.* (2011) ‘Integrative genomics viewer.’, *Nature biotechnology*, 29(1), pp. 24–6. doi: 10.1038/nbt.1754.

Robinson, L. L. L. (2001) ‘Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad’, *Molecular Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP), 7(9), pp. 845–852. doi: 10.1093/molehr/7.9.845.

Roelofs, H. *et al.* (2000) ‘Restricted 12p amplification and RAS mutation in human germ cell tumors of the adult testis’, *American Journal of Pathology*, 157(4), pp. 1155–1166. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64631-7.

Runyan, C. *et al.* (2006) ‘Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration’, *Development*, 133(24), pp. 4861–4869. doi: 10.1242/dev.02688.

Al Sarakbi, W. *et al.* (2009) ‘The mRNA expression of SETD2 in human breast cancer: correlation

with clinico-pathological parameters.’, *BMC cancer*. BioMed Central, 9, p. 290. doi: 10.1186/1471-2407-9-290.

Scharnhorst, V., van der Eb, A. J. and Jochemsen, A. G. (2001) ‘WT1 proteins: functions in growth and differentiation.’, *Gene*, 273(2), pp. 141–61. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00593-5.

Schmiedel, S. *et al.* (2010) ‘Testicular Germ Cell Cancer Incidence in an Immigration Perspective, Denmark, 1978 to 2003’, *Journal of Urology*, 183(4), pp. 1378–1382. doi: 10.1016/j.juro.2009.12.058.

Schrader, M. *et al.* (no date) ‘Quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in testicular germ cell tumors by quantitative fluorescence real-time RT-PCR.’, *Oncology reports*, 9(5), pp. 1097–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12168080> (Accessed: 16 November 2019).

Schumacher, V. *et al.* (1998) ‘Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with WT1 missense mutations’, in *Kidney International*. Nature Publishing Group, pp. 1594–1600. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00948.x.

Seth, R. and Singh, A. (2015) ‘Leukemias in Children’, *Indian Journal of Pediatrics*. Springer India, pp. 817–824. doi: 10.1007/s12098-015-1695-5.

Shanmugalingam, T. *et al.* (2013) ‘Global incidence and outcome of testicular cancer.’, *Clinical epidemiology*, 5, pp. 417–27. doi: 10.2147/CLEP.S34430.

Sheikine, Y. *et al.* (2012) ‘Molecular genetics of testicular germ cell tumors.’, *American journal of cancer research*. e-Century Publishing Corporation, 2(2), pp. 153–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22432056> (Accessed: 7 December 2018).

Shen, H. *et al.* (2018) ‘Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors’, *Cell Reports*. Elsevier B.V., 23(11), pp. 3392–3406. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.039.

Sithanandam, G. *et al.* (1990) ‘Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies’, *Oncogene*, 5(12), pp. 1775–1780.

Skakkebaek, N. E. *et al.* (1987) ‘Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma.’, *International journal of andrology*, 10(1), pp. 19–28. doi: 10.1111/j.1365-2605.1987.tb00161.x.

Skakkebaek, N. E. (1972) ‘POSSIBLE CARCINOMA-IN-SITU OF THE TESTIS’, *The Lancet*, 300(7776), pp. 516–517. doi: 10.1016/S0140-6736(72)91909-5.

- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E. and Main, K. M. (2001) 'Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion', *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP), 16(5), pp. 972–978. doi: 10.1093/humrep/16.5.972.
- Skoneczna, I. A. *et al.* (2014) 'Sorafenib monotherapy in patients with inoperable/recurrent germ cell tumors (GCT) refractory to chemotherapy: Phase II study.', *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology (ASCO), 32(4_suppl), pp. 367–367. doi: 10.1200/jco.2014.32.4_suppl.367.
- Skotheim, R. I. *et al.* (2003) 'The testicular germ cell tumour genome', in *APMIS*, pp. 136–151. doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.11101181.x.
- Skotheim, R. I. and Lothe, R. A. (2003) 'The testicular germ cell tumour genome.', *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 111(1), pp. 136–50; discussion 50-1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752254> (Accessed: 12 July 2018).
- Su, X. *et al.* (2017) 'NSD1 inactivation and SETD2 mutation drive a convergence toward loss-of-function of H3K36 writers in clear-cell renal cell carcinomas', *Cancer Research*, 77(18), p. canres.0143.2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0143.
- Summers, K. *et al.* (2007) 'Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML.', *Leukemia*, 21(3), pp. 550–1; author reply 552. doi: 10.1038/sj.leu.2404514.
- Talevich, E. *et al.* (2016) 'CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing.', *PLoS computational biology*, 12(4), p. e1004873. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004873.
- Tammela, T. *et al.* (2008) 'Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation', *Nature*, 454(7204), pp. 656–660. doi: 10.1038/nature07083.
- Taylor-Weiner, A. *et al.* (2016) 'Genomic evolution and chemoresistance in germ-cell tumours.', *Nature*, 540(7631), pp. 114–118. doi: 10.1038/nature20596.
- Thomas-Tikhonenko, A. and Cozma, D. (2008) 'PAX5 and B-cell neoplasms: Transformation through presentation', *Future Oncology*, pp. 5–9. doi: 10.2217/14796694.4.1.5.
- Turnbull, C. and Rahman, N. (2011) 'Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour', *International Journal of Andrology*, 34(4pt2), pp. e86–e97. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01162.x.

- Virappane, P. *et al.* (2008) ‘Mutation of the Wilms’ tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party.’, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(33), pp. 5429–35. doi: 10.1200/JCO.2008.16.0333.
- Voorhoeve, P. M. *et al.* (2007) ‘A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors (Reprinted from Cell, vol 124, pg 1169-1181, 2006)’, *Cell*, 131, pp. 102–114. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.037.
- Vougiouklakis, T. *et al.* (2015) ‘The NSD family of protein methyltransferases in human cancer.’, *Epigenomics*, 7(5), pp. 863–74. doi: 10.2217/epi.15.32.
- Wang, J. *et al.* (2019) ‘WT1 influences apoptosis and proliferation of immature mice granular cells through regulation of the wnt/ β -catenin signal pathway.’, *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 65(7), pp. 138–145. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31880532> (Accessed: 10 January 2020).
- Wang, N. *et al.* (2018) ‘Study on the methylation status of SPINT2 gene and its expression in cervical carcinoma’, *Cancer Biomarkers*. IOS Press, 22(3), pp. 435–442. doi: 10.3233/CBM-171050.
- Wang, Y. *et al.* (2015) ‘WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation’, *Molecular Cell*. Cell Press, 57(4), pp. 662–673. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.023.
- Wang, Z. *et al.* (2017a) ‘Meta-analysis of five genome-wide association studies identifies multiple new loci associated with testicular germ cell tumor.’, *Nature genetics*. NIH Public Access, 49(7), pp. 1141–1147. doi: 10.1038/ng.3879.
- Wang, Z. *et al.* (2017b) ‘Meta-analysis of five genome-wide association studies identifies multiple new loci associated with testicular germ cell tumor’, *Nature Genetics*, 49(7), pp. 1141–1147. doi: 10.1038/ng.3879.
- Wang, Z. Y. *et al.* (1995) ‘Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms’ tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways’, *Oncogene*, 10(3), pp. 415–422.
- Wermann, H. *et al.* (2010) ‘Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: Association with differentiation and cisplatin resistance’, *Journal of Pathology*, 221(4), pp. 433–442. doi: 10.1002/path.2725.

- Wong, J. C. Y. *et al.* (2003) 'Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia.', *Human molecular genetics*, 12(16), pp. 2063–76. doi: 10.1093/hmg/ddg219.
- Wu, S. R. *et al.* (2019) 'HAI-2 as a novel inhibitor of plasmin represses lung cancer cell invasion and metastasis', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 120(5), pp. 499–511. doi: 10.1038/s41416-019-0400-2.
- Yano, S. *et al.* (2014) 'Invading cancer cells are predominantly in G0/G1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(6), pp. 953–60. doi: 10.4161/cc.27818.
- Zeron-Medina, J. *et al.* (2013) 'XA polymorphic p53 response element in KIT ligand influences cancer risk and has undergone natural selection', *Cell*. Cell Press, 155(2), p. 410. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.017.
- Zhu, X. *et al.* (2014) 'Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia', *Nature Genetics*, 46(3), pp. 287–293. doi: 10.1038/ng.2894.
- Zuo, X. *et al.* (2018) 'The histone methyltransferase SETD2 is required for expression of acrosin-binding protein 1 and protamines and essential for spermiogenesis in mice.', *The Journal of biological chemistry*, 293(24), pp. 9188–9197. doi: 10.1074/jbc.RA118.002851.

9. Seznam publikací a přednášek

Publikace:

Bakardjieva-Mihaylova V, Skvarova Kramarzova K, Slamova M, Svaton M, Rejlova K, Zaliova M, Dobiasova A, Fiser K, Stuchly J, Grega M, Rosova B, Zachoval R, Klezl P, Eis V, Kindlova E, Buchler T, Trka J, Boublikova L. Molecular Basis of Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 6;11(9). pii: E1316. doi: 10.3390/cancers11091316. IF 6,162

Bakardjieva-Mihaylova V, Škvárová Kramarzová K, Slámová M, Büchler T, Boublíková L. *Klin Onkol*. Winter 2017;30(6):412-419. doi: 10.14735/amko2017412. Review. Molekulární patogeneze testikulárních germinálních nádorů, Czech.

Boublikova L, **Bakardjieva-Mihaylova V**, Skvarova Kramarzova K, Kuzilkova D, Dobiasova A, Fiser K, Stuchly J, Kotrova M, Buchler T, Dusek P, Grega M, Rosova B, Vernerova Z, Klezl P, Pesl M, Zachoval R, Krolupper M, Kubecova M, Stahalova V, Abrahamova J, Babjuk M, Kodet R, Trka J. Wilms tumor gene 1 (WT1), TP53, RAS/BRAF and KIT aberrations in testicular germ cell tumors. *Cancer Lett*. 2016 Jul 1;376(2):367-76. doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.016. Epub 2016 Apr 13. IF 6.375 (sdílené první autorství)

Publikace přímo nesouvisející s tématem dizertační práce:

Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, Novakova M, **Bakardjieva-Mihaylova V**, Fiser K, Stuchly J, Giraud M, Salson M, Pott C, Brüggemann M, Füllgrabe M, Stary J, Trka J, Fronkova E. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*. 2015 Aug 20;126(8):1045-7. doi: 10.1182/blood-2015-07-655159. IF 11.847

Svaton M, Skvarova Kramarzova K, Kanderova V, Mancikova A, Smisek P, Jesina P, Krijt J, Stiburkova B, Dobrovolny R, Sokolova J, **Bakardjieva-Mihaylova V**, Vodickova E, Rackova M, Stuchly J, Kalina T, Stary J, Trka J, Fronkova E, and Kozich V. A homozygous deletion in the SLC19A1 gene as a cause of folate-dependent recurrent megaloblastic anemia. *Blood*. 2020. IF 16.562

Přednášky a postery:

L.Boublikova, K.Kramarzova, **V. Bakardjieva-Mihaylova**, T.Buchler, P.Dusek, M.Grega, B.Rosova, J.Abrahamova, J.Trka. Účast na The European Cancer Congress 2013, 27.09.-01.10., 2013 Amsterdam, poster.

Boublikova L, **Bakardjieva-Mihaylova V**, Skvarova Kramarzova K, Buchler T, Dusek P, Grega M, Rosova B, Vernerova Z, Klezl P, Capoun O, Pesl M, Zachoval R, Krolupper M, Kubecova M, Stahalova V, Benkova K, Abrahamova J, Babjuk M, Kodet R, Trka J, poster na 8th Copenhagen Workshop in CIS testis and germ cell cancer, Copenhagen, 18-20May 2014, Denmark, poster.

L.Boublikova, K.Kramarzova, **V.Bakardjieva-Mihaylova**, T. Buchler, P.Dusek, M.Grega, B. Rosova, Z.Vernerova, J.Abrahamova, J.Trka, přednáška na The 7th International Conference on WT1 in human neoplasia, 2014 Barcelona, přednáška.

Bakardjieva-Mihaylova V, Boublikova L, Škvárová Kramarzova K, Kužílková D, Kotrová M, Buchler, Dusek P, Grega M, Rosova B, Abrahamova J, Trka J. Molekulárně-biologické charakteristiky germinálních nádorů varlat. Vědecká konference 2.LF UK, Praha, ČR (2017), poster.

Boublikova L, **Bakardjieva-Mihaylova V**, Škvárová Kramarzová K, Slámova M, Stuchlý J, Rosova B, Zachoval R, Rozsypalová A, Prokš J, Donátová Z, Buchler T, Trka J. Molekulární podstata cisplatinové rezistence u pacientů s testikulárními germinálními nádory

Bakardjieva-Mihaylova V, Škvárová Kramarzová K, Slámova M, Svatoň M, Rejlová K, Žaliová M, Dobiášová A, Fišer K, Stuchlý J, Grega M, Rosová B, Buchler T, Trka J, Boubliková L. Molekulární podstata rezistence na cisplatinu u testikulárních germinálních nádorů. Vědecká konference 2.LF UK, Praha, ČR (2019), poster.

Boublikova L, **Bakardjieva-Mihaylova V**, Skvarova Kramarzova K, Slamova M, Svaton M, Kubricanova-Zaliova M, Dobiasova A, Fiser K, Stuchly J, Grega M, Rosova B, Buchler T, Trka J, Modelling cisplatin resistance in testicular germ cell tumor, poster.

10. Přílohy