

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině  
Studijní obor: Zobrazovací metody v lékařství



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**MUDr. Michaela Bártů**

Srovnání morfologie, exprese, epigenetických změn a mutací HNF1B  
v solidních nádorech a nenádorových lézích.

*The comparison of morphology, expression, epigenetic changes and  
mutations of HNF1B in solid tumors and non-neoplastic lesions.*

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.

Praha, 2021

**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, 22.3.2021

Michaela B Á R T Ů

Podpis

**Identifikační záznam:**

BÁRTŮ, Michaela. Srovnání morfologie, exprese, epigenetických změn a mutací HNF1B v solidních nádorech a nenádorových lézích. [The comparison of morphology, expression, epigenetic changes and mutations of HNF1B in solid tumors and non-neoplastic lesions]. Praha 2021. 156 stran, 33 příloh. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Školitel Dundr, Pavel

### **Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Pavlovi Dundrovi, Ph.D. za důsledné vedení a cenné rady při zpracování a psaní práce.

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu v biomedicině na Ústavu patologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v letech 2016 - 2021 s podporou grantových projektů Ministerstva zdravotnictví (RVO-VFN 64165 a AZV 17-28404A), Univerzity Karlovy (Program Progres Q28/LF1, UNCE 204065 a SVV 260367), Evropského fondu pro regionální rozvoj (Projekt BBMRI-CZ č. EF16\_013/0001674), a Operačního Programu Praha Konkurenceschopnost (OPPK, Výzkumná laboratoř nádorových onemocnění, CZ.2.16/3.1.00/24509).

**Obor:** Zobrazovací metody v lékařství

**Předseda oborové rady:** doc. MUDr. Andrea Burgetová, Ph.D., MBA

**Školící pracoviště:** Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Studničkova 2, Praha 2, 128 00

**Autor:** MUDr. Michaela Bártů

**Školitel:** prof. MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.

## Seznam použitých zkratk

AH	adenomyomatózní hyperplázie
BBM	Banka biologického materiálu
bp	pár bazí (base pair)
FFPE	materiál fixovaný ve formolu a zalitý do parafinu (formalin-fixed paraffin-embedded)
FT	čerstvě zmražená tkáň (fresh-frozen tissue)
ccRCC	světlobuněčný renální karcinom (clear cell renal cell carcinoma)
CLC	klinicky lokalizovaný karcinom prostaty (clinically localized carcinoma)
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CRC	karcinom prostaty rezistentní ke kastraci (castration-resistant carcinoma)
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
DFS	doba přežití bez nemoci (disease-free survival)
EMT	epitelo-mezenchymální tranzice
GS	Gleasonovo skóre
GWAS	celogenomové asociační studie (genome-wide association studies)
HG	high grade
HGSC	high grade serózní karcinom (high grade serous carcinoma)
HNF1B	hepatocytární jaderný faktor 1 beta (hepatocyte nuclear factor 1 beta)
<i>HNF1B</i>	gen pro hepatocytární jaderný faktor 1 beta
HRM	High Resolution Melting
chRCC	chromofobní renální karcinom (chromophobe renal cell carcinoma)
IHC	imunohistochemie, imunohistochemický/á
LFS	doba přežití bez lokální recidivy (local recurrence-free survival)
LG	low grade

MA	metanefrický adenom (metanephric adenoma)
MODY	diabetes dospělého typu objevující se u mladých lidí (maturity-onset diabetes of the young)
MFS	doba přežití bez vzdálených metastáz (metastasis-free survival)
MSI	mikrosatelitová instabilita
MTSCC	mucinózní tubulární a vřetenobuněčný karcinom
NCBI	National Center for Biotechnology information
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
OCCC	světlobuněčný karcinom ovária (ovarian clear cell carcinoma)
OS	celkové přežití (overall survival)
papRCC	papilární renální karcinom (papillary renal cell carcinoma)
PC	karcinom prostaty (prostate carcinoma)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PFS	přežití bez progrese nemoci (progression-free survival)
PSA	prostatický specifický antigen (prostate specific antigen)
RCAD	syndrom renálních cyst a diabetu (renal cysts and diabetes syndrome)
RO	renální onkocytom (renal oncocytoma)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SOC3	supresor cytokinové signalizace 3 (supressor of cytokine signaling 3)
TCF2	transkripční faktor 2 (transcription factor 2)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	tkáňový mikročip (tissue microarray)
TSS	místo začátku transkripce (transcription start site)
TURP	transuretrální resekce prostaty
VAF	frekvence variantní alely (variant allele frequency)

WHO

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

**Klíčová slova:** HNF1B, tumorigeneze, imunohistochemie, mutační analýza, metylační analýza

## OBSAH

---

1. ÚVOD .....	9
1.1. HNF1B sestříhové varianty .....	13
1.2. Germinální a somatické mutace <i>HNF1B</i> .....	15
1.3. Role HNF1B v tumorigenezi solidních nádorů .....	18
1.4. Imunohistochemická exprese HNF1B u vybraných solidních nádorů .....	20
1.4.1. Exprese v karcinomech tlustého střeva .....	20
1.4.2. Exprese v karcinomech ovária .....	20
1.4.3. Exprese v nádorech ledvin .....	21
1.4.4. Exprese v karcinomech prostaty .....	22
2. VYMEZENÍ CÍLŮ PRÁCE .....	23
3. MATERIÁL A METODY .....	26
3.1. Tkáně .....	26
3.1.1. Nádorová tkáň .....	27
3.1.1.1. Nádory tlustého střeva .....	27
3.1.1.2. Karcinomy ovária .....	29
3.1.1.3. Nádory ledvin .....	29
3.1.1.4. Karcinomy prostaty .....	30
3.1.2. Nenádorová tkáň .....	31
3.2. Imunohistochemické vyšetření .....	31
3.3. Biostatistické analýzy .....	32
3.4. Molekulárně biologické analýzy .....	34
3.4.1. Izolace nukleových kyselin a kontrola kvality .....	34
3.4.2. Příprava amplikonového NGS a sekvenace .....	35
3.4.3. Příprava panelové NGS a sekvenace .....	38
3.4.4. Biostatistická analýza získaných NGS dat .....	38
3.4.5. Analýza metylace <i>HNF1B</i> promotoru .....	39
3.4.6. Analýza mikrosatelitové instability .....	41
3.4.7. Shromáždění a analýza dat z The Cancer Genome Atlas databáze .....	42
4. VÝSLEDKY .....	43
4.1. Nádory tlustého střeva .....	43
4.1.1. Imunohistochemické vyšetření a biostatistické analýzy .....	43
4.1.2. Mutační analýza .....	51
4.1.3. Metylační analýza .....	52



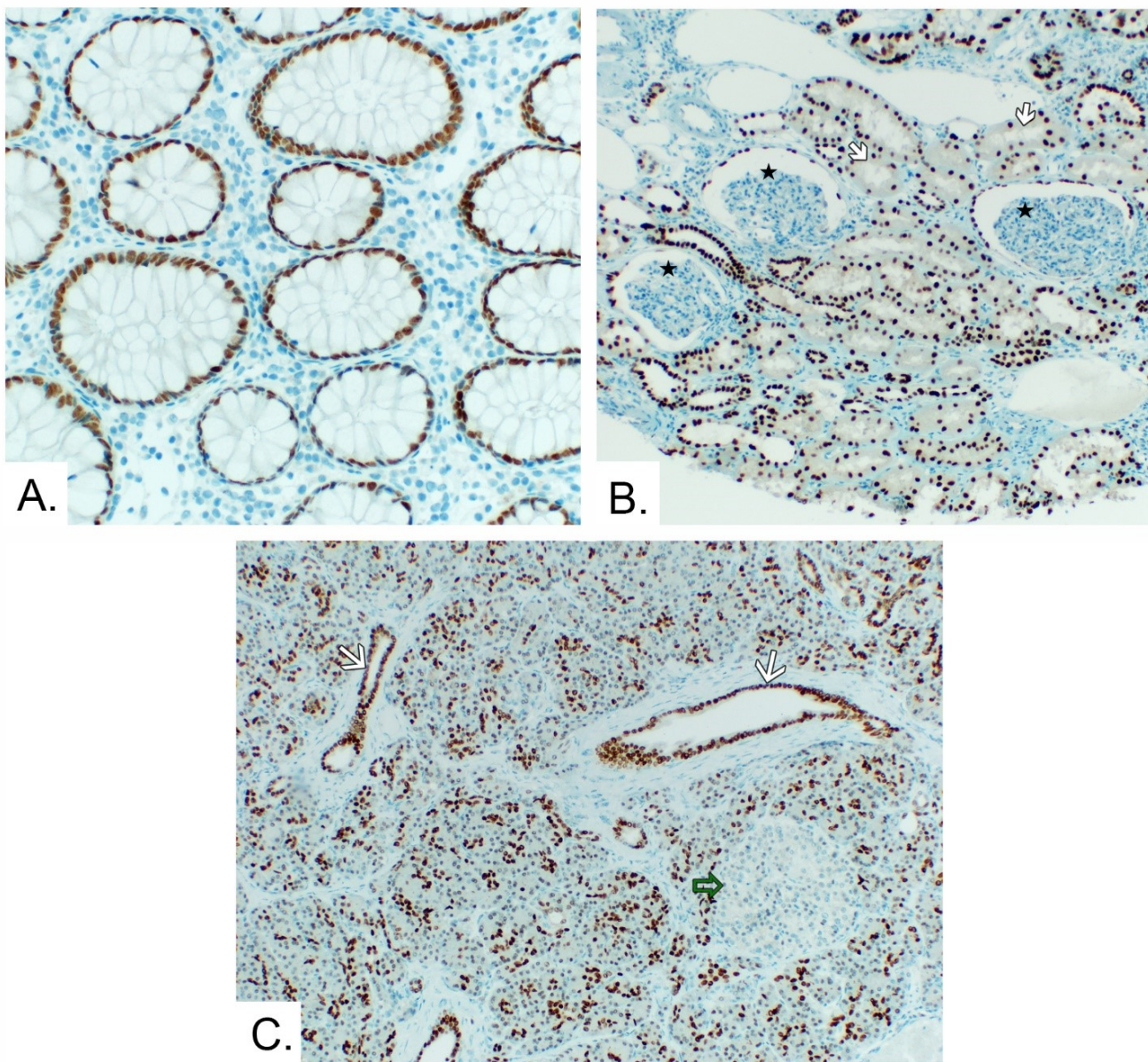
4.1.4. Analýza mikrosatelitové instability.....	53
4.2. Karcinomy ovária.....	55
4.2.1. Imunohistochemické vyšetření a biostatistické analýzy .....	55
4.2.2. Mutační analýza .....	58
4.2.3. Metylační analýza .....	58
4.3. Nádory ledvin.....	60
4.3.1. Imunohistochemické vyšetření a biostatistické analýzy .....	60
4.3.2. Mutační analýza .....	65
4.3.3. Metylační analýza .....	66
4.4. Nádorové a nenádorové léze prostaty .....	68
4.4.1. Imunohistochemické vyšetření a biostatistické analýzy .....	68
4.4.2. Mutační analýza .....	72
4.2.3. Metylační analýza .....	72
5. DISKUZE.....	74
6. ZÁVĚR.....	93
7. ABSTRAKT.....	95
8. SUMMARY .....	97
9. LITERATURA.....	99
10. PUBLIKACE, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTAČNÍ PRÁCE .....	119

## 1. ÚVOD

---

Hepatocytární jaderný faktor 1 beta (HNF1B), také známý pod označením transkripční faktor-2 (TCF2), je transkripční faktor, který hraje klíčovou roli během ontogenetického vývoje, kdy se podílí na regulaci diferenciaci viscerálního endodermu z primitivního endodermu (Cereghini 1996; Barbacci *et al.* 2004). *HNF1B* patří do genové superrodiny kódující transkripční faktory obsahující homeodoménu a kóduje transkripční faktor Pit-1/Oct-1/Unc-86 (POU), který je zásadní pro regulaci signálních drah účastnících se řízení endodermálního vývoje (Alvelos *et al.* 2015). Ačkoliv byl tento faktor popsán poprvé v hepatocytech (což vedlo k pojmenování celé této rodiny), jeho nejvýznamnější působení spočívá ve vývoji a diferenciaci zejména ledvin, pankreatu a biliárního traktu. U dospělých jedinců je proto exprese HNF1B pozorována především v epiteliálních tkáních vytvářejících tubulární formace, jako jsou například právě kanálky ledvin či pankreatické vývody (Yu *et al.* 2015a). Podle komplexních RNA-Seq dat (GTEx Portal; (Carithers *et al.* 2015) je ale HNF1B exprimován také v dalších tkáních jako jsou tenké a tlusté střevo, žaludek, játra, plíce, prostata a varlata (Obr.1). Kromě buněčné diferenciaci se HNF1B účastní také regulace exprese řady genů podílejících se na modulaci buněčného cyklu, citlivosti k apoptóze, odpovědi na oxidační stres a na řízení glukózového metabolismu (Pontoglio 2000; Tsuchiya *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2015).

Gen *HNF1B* je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu 17 (17q12) a skládá se z 9 exonů, jež pokrývají přibližně 60 kb (MIM#189907). HNF1B je součástí jedné ze čtyř hlavních rodin hepatocytárních jaderných faktorů, které se skládají z rodiny HNF1 (HNF1 $\alpha$  a HNF1 $\beta$ ), HNF3 (neboli FOXA, skládající se z FOXA1, FOXA2 a FOXA3), HNF4 (HNF4 $\alpha$  a HNF4 $\gamma$ ) a HNF6 (neboli ONECUT, OC, tvořený OC1, OC2 a OC3)(Lau *et al.* 2018).



**Obr. 1.** Příklady imunohistochemické exprese HNF1B u nenádorových adultních tkání. A) Difúzní silná jaderná pozitivita HNF1B v epiteliích vystýlajících krypty tlustého střeva (200x). B) Parenchym kůry ledviny, kde je patrná silná pozitivita barvení HNF1B v epiteliích proximálních tubulů (*bílá šipka*), zatímco struktury glomerulů jsou negativní (*černá hvězdička*) (100x). C) Parenchym pankreatu s pozitivitou epiteliálních buněk exokrinních acinů a epitelií vystýlajících intrapancreatické vývody (*bílé šipky*). Struktury Langerhansových ostrůvků jsou zcela negativní (*zelená šipka*) (100x).

HNF1B je transkripční faktor jež obsahuje celkem tři funkční domény: DNA-vázací doménu (tvořenou POU-homeodoménou a POU-specifickou doménou), transaktivační doménu a dimerizační doménu (El-Khairi & Vallier 2016). DNA-vázací doména HNF1B se specificky váže k palindromické konsenzuální sekvenci GTTAATNATTANC, zatímco dimerizační doména (umístěná na N-terminálním konci) umožňuje HNF1A i HNF1B vytvářet ve vazebném místě homo- či heterodimery (De Simone & Cortese 1991).

Vzhledem k tomu, že exprese HNF1B souvisí zejména s embryonálním vývojem ledvin, pankreatu, biliárního traktu, jater a reprodukčního systému, mutace v tomto genu jsou spojované s celou řadou vrozených vývojových onemocnění těchto orgánů. Heterozygotní germinální mutace vedou k vývoji komplexních malformací urogenitálního traktu a pankreatu, které jsou souhrnně označovány jako syndrom renálních cyst a diabetu (renal cysts and diabetes syndrome, RCAD) (Adalat *et al.* 2009). Genové mutace mohou také postihnout reprodukční systém, s klinickými projevy ve formě abnormalit vývoje genitálu u žen a azoospermie u mužů (Anik *et al.* 2015). *HNF1B* také patří mezi geny spojované s vývojem jednoho z monogenních typů diabetu mellitu – MODY diabetu (maturity-onset diabetes of the young), konkrétně jeho podtypu MODY 5. Tento typ diabetu je fenotypicky charakterizovaný insulinovou rezistencí a dysfunkcí beta buněk endokrinních pankreatických ostrůvků (Anik *et al.* 2015).

V posledních letech se také objevuje narůstající počet důkazů o tom, že by HNF1B mohl být součástí patogeneze některých solidních nádorů. HNF1B je diskutován zejména v souvislosti se vznikem a progresí světlobuněčných karcinomů ovária a ledvin, ale jeho působení je zmiňováno i v souvislosti s nádory jater, gastrointestinálního traktu, pankreatu a prostaty. Navzdory narůstajícímu zájmu o tento aspekt jeho působení a počtu studií, které se touto problematikou zabývají, jsou informace o možných somatických mutacích genu *HNF1B* přítomných v jednotlivých typech nádorů stále vzácné. Oblastí, které je v literatuře věnován větší prostor, je ale problematika jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide

polymorphisms, SNP) v nekódujících intronických sekvencích tohoto genu. Pro *HNF1B* tak již bylo popsáno několik SNPs, které jsou spojovány se zvýšeným rizikem vývoje karcinomu ledvin (Rebouissou *et al.* 2005) a karcinomu endometria (Setiawan *et al.* 2012; Painter *et al.* 2015). Dále byly identifikovány také některé rasově specifické *HNF1B* varianty asociované s rizikem vzniku karcinomu prostaty (Berndt *et al.* 2011; Hindorff *et al.* 2011). Objevují se také data o roli *HNF1B* ve vývoji karcinomu pankreatu (Janky *et al.* 2016), zatímco pro jiné maligní nádory, jako je například karcinom tlustého střeva, tento vztah zatím nebyl potvrzen (Elliott *et al.* 2010). U některých nádorů je také vyzdvihován vliv epigenetických alterací genu *HNF1B*, a to zejména epigenetické inaktivace tohoto genu. Hypermetylace promotoru *HNF1B* popisovaná autory Silva *et al.* byla dokonce navržena jako možný neinvazivní epigenetický marker onemocnění kolorektálním karcinomem (Silva *et al.* 2013).

Přesný mechanismus, jakým se *HNF1B* účastní procesu karcinogeneze, nebyl ještě objasněn a je pravděpodobné, že se liší v závislosti na konkrétním nádorovém onemocnění. Velmi zajímavé jsou dosavadní poznatky, které naznačují, že v závislosti na typu tkáně a nádoru by *HNF1B* mohl působit buď jako tumorsupresorový gen nebo jako protoonkogen. Jak přesně je ale konkrétní vliv uplatňován nicméně ještě nebylo objasněno a existují studie, které označují *HNF1B* jako pro-diferenciační faktor se silnou tumorsupresorovou aktivitou ve zdravých tkáních (Ross-Adams *et al.* 2016), zatímco jiné studie jej naopak označují jako onkogen ve tkáních, které prošly maligní transformací. U těchto tkání má mít *HNF1B* naopak schopnost indukovat rakovinný fenotyp a aktivovat vznik invazivního onemocnění prostřednictvím aktivace epitel-mezenchymální tranzice (EMT) (Matsui *et al.* 2016).

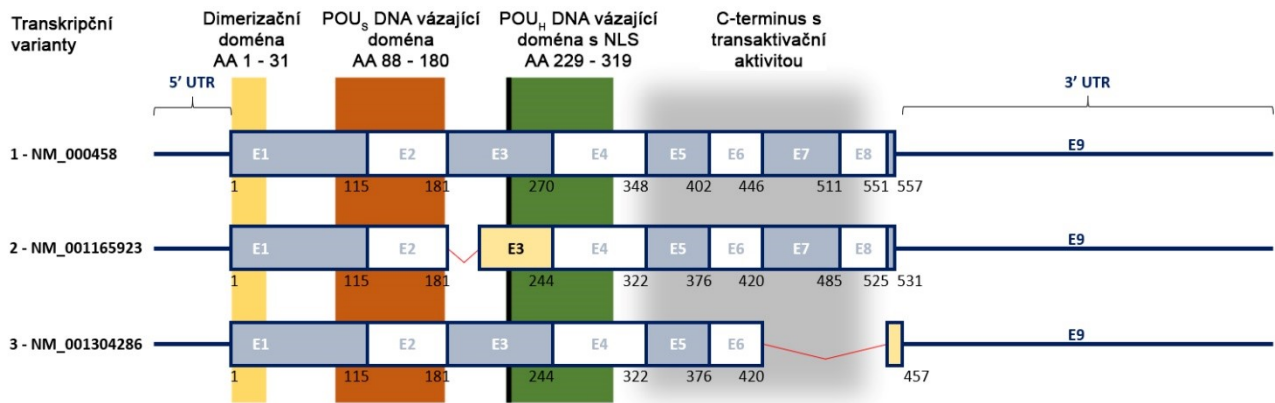
V souvislosti s těmito poznatky byly publikovány práce, které udávají, že exprese proteinu *HNF1B* je alterována u několika typů nádorových onemocnění a v závislosti na tom, o které onemocnění se jedná, byla popsána jak up, tak downregulace jeho exprese. Závěry

těchto prací jsou nicméně často rozporuplné a konfliktní výsledky jsou často popisovány i pro stejné typy nádorových onemocnění v závislosti na autorech provedených studií.

### 1.1. HNF1B sestřihové varianty

Aktuálně dostupná literární data neposkytují zcela jasné informace o celkovém počtu a charakteristice jednotlivých izoform genu *HNF1B*. Data publikovaná v databázích NCBI a Ensemble uvádí, že *HNF1B* má celkem tři plně charakterizované izoformy: divokou (wild type) variantu 1 a další dvě alternativní sestřihové varianty; variantu 2 a 3. Wild type transkripční varianta 1 (GenBank NM\_000458) je dlouhá 2815 pb a dává vznik proteinové izoformě 1 o 557 aminokyselinách (UniProtKB P35680). Alternativní sestřihová varianta 2 (GenBank NM\_001165923) je dlouhá 2746 bp a kóduje protein o 531 aminokyselinách s kratším exonem 3, který v porovnání s variantou 1 neobsahuje aminokyseliny 183-208. Alternativní sestřihová varianta 3 má nejkratší délku se 2432 bp (GenBank NM\_001304286) a kóduje protein o 457 aminokyselinách, který má oproti variantě 1 také zkrácený exon 3 s chybějícími aminokyselinami 420-551 na C-terminálním konci řetězce, což vede k přeskočení exonů 7 a 8. Databáze Ensemble obsahuje také zmínky o dalších *HNF1B* proteinových izoformách, nicméně bez udání bližších informací o jejich referenční mRNA sekvenci či dalších vlastnostech. Přesná charakteristika existujících izoform proteinu HNF1B v různých lézích není v literatuře popsána, a výsledky dostupných publikovaných studií i data publikovaná v molekulárně genetických databázích neposkytují jednoznačné informace. Literární popis *HNF1B* proteinových izoform je vysoce inkonzistentní a mnohdy rozporuplný, což zčásti souvisí i s nejednoznačným pojmenováním jednotlivých izoform, které se v různých pracích označují buď čísly 1, 2 a 3 nebo písmeny A, B a C. Dále se navíc ukazuje, že izoformy popsané ve starší publikované literatuře neodpovídají přesně izoformám, které jsou v současné době uváděné v databázích NCBI a Ensemble, jejichž data jsou založená na výsledcích projektů věnujících se

masivnímu paralelnímu sekvenování genomů a transkriptomů (a tudíž pravděpodobně i založená na přesnějších údajích). Komplexní přehledové schéma současných znalostí o HNF1B izoformách a jejich doménách je zpracováno v Obr. 2. (Bartu *et al.* 2018)



**Obr. 2 (převzato z Bártů *et al.*, 2018).** Schematický diagram HNF1B transkriptů (dle dat z RefSeq databáze). Modré a bílé obdélníky znázorňují kódující oblasti referenčních exonů, počet aminokyselin (AA) je uvedený pod korespondujícími exony. Žluté obdélníky představují alternativní exony. Oblasti, které jsou zvýrazněné žlutě, hnědě, černě, zeleně a šedě představují funkční domény napříč HNF1B transkripty. Délky exonů jsou zobrazeny proporcionálně dle jejich skutečné délky. Transkript 2 postrádá 26 AA (78 bp) na 5' konci exonu 3. Transkript 3 postrádá celý exon 7 a 8 a obsahuje alternativní stop kodon v exonu 9 (umístěný 110 bp za původním stop kodonem). Zkratky: UTR – nepřekládaná oblast, NLS – jaderný lokalizační signál, POU<sub>S</sub> – POU-specifická doména, POU<sub>H</sub> – POU homeodoména

Přesná charakteristika těchto variant, a dokonce i jejich počet je nicméně v současné době zpochybňovaná, přičemž jejich přítomnost v různých lézích nebyla podle našeho nejlepšího vědomí do této doby předmětem žádného výzkumu. Samotná charakteristika a publikované informace o výše popsaných třech izoformách také nejsou konzistentní a mezi literárně popsanými sekvencemi a jejich názvy existují výrazné rozdíly.

Jak již bylo zmíněno výše, exprese HNF1B proteinu je alterovaná u několika různých typů solidních nádorů a v závislosti na typu nádoru jsou popisovány jak up, tak downregulace této exprese. Analýzou vlivu konkrétních sestřihových variant se do této doby zabývala pouze

jedna studie, jejíž autoři poukazují na rozdíl v expresi jednotlivých izoforem mezi zdravou prostatickou tkání a karcinomem prostaty (Harries *et al.* 2010). Na celkem 39 vzorcích benigní prostatické hyperplázie a 21 vzorcích adenokarcinomu prostaty tito autoři popsali změny v expresi B a C izofomy HNF1B, nicméně dopad jejich výsledků je sporný, vzhledem k tomu, že od doby publikace této práce bylo prokázáno, že varianta C (RefSeq NM\_006481) neexistuje a její záznam byl permanentně odstraněn z NCBI databáze. Souhrnná data o mRNA expresi jednotlivých HNF1B transkriptů jsou tedy prozatím stále postrádána.

## 1.2. Germinální a somatické mutace *HNF1B*

Bezchybná funkce *HNF1B* je nezbytná pro aktivaci segment-specifického genového programu, který je klíčový pro správný vývoj a funkci nefronů (Banyai *et al.* 2018). Během ontogenetického vývoje ledvin *HNF1B* zajišťuje náležitou interakci mezi ureterálním pupenem a metanefrickým mezenchymem, která je nutná pro správné větvení ureterálního pupenu a epitel-mezenchymální tranzici (Bockenbauer & Jaureguiberry 2016; Ferre & Igarashi 2019). Heterozygotní germinální mutace genu *HNF1B* jsou nejčastější monogenní příčinou vývojových onemocnění ledvin a jako takové jsou spojovány s celou škálou renálních malformací, které u postižených jedinců vedou k chronické poruše renálních funkcí, a nakonec k chronickému renálnímu selhání (Clissold *et al.* 2015; Clissold *et al.* 2018; Okorn *et al.* 2019; Omura *et al.* 2019). Pro toto postižení renálních funkcí byl v klinické praxi recentně zavedený nový termín – autosomálně dominantní tubulointersticiální onemocnění ledvin (ADTKD-HNF1B) (Kompatscher *et al.* 2018). *HNF1B* mutace jsou také spojovány s poruchami ve funkci jater a ledvin, atrofií pankreatu, malformacemi genitálií a komplexními syndromy jako je RCAD, MODY5 či neonatální diabetes (Bellanne-Chantelot *et al.* 2004; Edghill *et al.* 2006; Lokmane *et al.* 2008; Adalat *et al.* 2009). Fenotypické projevy germinálních mutací *HNF1B* také zahrnují hypomagnezémii a renální ztráty magnézia, což naznačuje, že *HNF1B* hraje roli



nejen v nefronogenezi a tubulogenezi, ale i v dalším udržování renálních tubulárních funkcí (Adalat *et al.* 2009). Mezi vzácnější poruchy patří například i mutace *HNF1B*, která je spojována s hypoplastickým glomerulocystickým onemocněním ledvin projevujícím se neonatální renální dysfunkcí (Alvelos *et al.* 2015).

Spektrum germinálních mutací *HNF1B* genu zahrnuje především substituce bází a malé inserce-delece či celogenové delece, u kterých se uplatňuje autosomálně dominantní typ dědičnosti (nicméně až 50 % z těchto alterací vzniká *de novo*) (Clissold *et al.* 2015; Stiles *et al.* 2018; Madariaga *et al.* 2019). Jeden z navržených mechanismů, jakým *HNF1B* reguluje renální tubulogenezi, je kontrola exprese supresoru cytokinové signalizace 3 (SOC3) a recentní studie provedené na myších modelech naznačují, že *HNF1B* by mohl mít dvě odlišné základní funkce: jako klasický transkripční aktivátor, anebo jako takzvaný „bookmarking“ faktor, jehož funkcí je označení cílových genů pro rapidní transkripční reaktivaci po proběhnutí mitotického cyklu (Ke-Sheng Wang 2014).

Mezi další popsané fenotypické projevy *HNF1B*-asociovaných onemocnění patří také autismus, dna, epilepsie a primární hyperparathyroidismus, nicméně přesná charakteristika těchto onemocnění spojených s germinálními mutacemi *HNF1B* je mimo záběr této práce.

Zatímco v odborné literatuře bylo do současnosti popsáno více než 100 jednotlivých germinálních mutací, které se nejčastěji manifestují ve formě vzácných vývojových onemocnění ledvin (Heidet *et al.* 2010; Alvelos *et al.* 2015; Dubois-Laforgue *et al.* 2017), problematika somatických mutací a jejich asociace se vznikem nádorových onemocnění je mnohem méně prozkoumaná. Jediné dostupné poznatky v této oblasti reprezentuje několik publikovaných kazuistik popisujících případy chromofobního renálního karcinomu spojeného s kombinovanou monoalelickou germinální a somatickou mutací v genu *HNF1B* (Lebrun *et al.* 2005; Rebouissou *et al.* 2005; Clissold *et al.* 2015; Bockenhauer & Jaureguierry 2016; Verhave *et al.* 2016).

S výjimkou těchto několika vzácných případů zatím v literatuře prakticky neexistují žádná data, která by se zabývala somatickými variantami v kódující sekvenci genu *HNF1B* u různých typů solidních nádorů (včetně karcinomu prostaty, ledvin a tlustého střeva). Naprostá většina publikovaných studií v této oblasti se zaměřuje na analýzu intronických sekvencí a potenciálně významné SNPs. Přehled jednotlivých SNPs, které mají na základě literární rešerše dostupné literatury největší potenciální význam z hlediska jejich vlivu na vývoj solidních nádorů, je shrnutý v Tab. 1, společně s jejich umístěním v *HNF1B* genu.

Alterace detekované ve vzorcích nádorové tkáně jsou zaznamenávané v databázi Cosmic, společně s variantami popsány v rámci velkých, systematických studií publikovaných v recenzovaných odborných časopisech. Výsledkem je několik popsanych alterací genu *HNF1B* u různých typů nádorů, které zahrnují mutace, variabilitu počtu kopií a metylaci promotoru. Nicméně informace o somatickém či germinálním původu těchto změn často zcela chybí a pouze několik z těchto alterací má potvrzený somatický původ (Forbes *et al.* 2015). V naší předchozí práci jsme provedli screening genetických variant v celých kódujících sekvencích *HNF1B*, který odhalil celkem čtyři mutace ve 30 vyšetřovaných endometroidních karcinomech endometria a jednu missense variantu mezi 12 vyšetřovanými světlobuněčnými karcinomy ovária (ovarian clear cell carcinoma, OCCC) (Nemejcova *et al.* 2015). S výjimkou této práce nebyly zatím publikovány žádné studie, které by se genetickými změnami *HNF1B* u solidních nádorů zabývaly.

**Tabulka 1.** Přehled nejčastěji popisovaných SNP u různých typů nádorů, s uvedením jejich lokalizace v genu *HNF1B* a studované kohorty nádorů, kde vliv SNP na karcinogenezi dosáhl statistického významu.

SNP	Lokalizace v HNF1B	Pozice na chromozomu 17, GRCh37	Studovaná kohorta	Reference
rs4430796	intron 2	g.36098040G>A	karcinom endometria	Setiawan et al., 2012; Spurdle et al., 2011; Mandato et al., 2015
			světlobuněčný karcinom ovária	Shigetomi et al., 2014
			karcinom prostaty	Berndt et al., 2011; Elliott et al., 2010; Chornokur et al., 2013; Kim et al., 2011; Thomas et al., 2008; Zhao et al., 2015; Grisanzio et al., 2012; Hu et al., 2013; Sun et al., 2008; Harries et al., 2010
rs757210	intron 2	g.36096515T>C/G	karcinom ovária	Ross-Adams et al., 2016
rs7501939	intron 1	g.36101156T>C	karcinom prostaty	Elliott et al., 2010; Chornokur et al., 2013; Kim et al., 2011
rs11649743	intron 4	g.36074979G>A	karcinom prostaty	Harries et al., 2010; Sun et al., 2008;
rs7405696	intron 1	g.36102035G>C	karcinom prostaty	Berndt et al., 2011; Kim et al., 2011
rs4794758	intron 4	g.36080428C>T	karcinom prostaty	Berndt et al., 2011
rs1016990	intron 4	g.36088915G>C	karcinom prostaty	Berndt et al., 2011
rs3094509	intron 6	g.36062299A>G	karcinom prostaty	Berndt et al., 2011
rs11868513	intron 8	g.36052692G>A	karcinom prostaty	Kim et al., 2011
rs2074429	intron 6	g.36061297C>T	karcinom prostaty	Kim et al., 2011

### 1.3. Role HNF1B v tumorigenezi solidních nádorů

Na základě rešerše dostupných literárních poznatků je zřejmé, že genetické a epigenetické změny *HNF1B* hrají v tumorigenezi solidních nádorů velmi pleiotropní roli, která se liší v závislosti na histogenezi daného nádoru. Jedním ze základních popsanych mechanismů, prostřednictvím kterých se *HNF1B* účastí na procesu karcinogeneze, je jeho funkce v regulaci buněčného cyklu prostřednictvím interakce s proteiny kontrolních bodů buněčného cyklu RB1 a p27, společně s jeho vlivem na regulaci glukózového metabolismu, buněčné migrace, adheze a proliferace, a v neposlední řadě také již výše zmíněné epitel-mezenchymální tranzice (Desgrange *et al.* 2017; Chan *et al.* 2018). V tomto kontextu se tak *HNF1B* uplatňuje jako

regulační gen, který svou funkci plní prostřednictvím udržování aktivní transkripce i navzdory efektu vyvolaného mitotickou kondenzací chromatinu (Sun *et al.* 2008).

Jak již zde bylo uvedeno, HNF1B je v literatuře spojován u různých solidních nádorů jak s protoonkogenním, tak s tumorsupresorovým efektem. U hepatocelulárního karcinomu (Shim *et al.* 2013; Yu *et al.* 2015b), karcinomu prostaty (Noto *et al.* 2010), karcinomu ze žloutkového váčku (Rougemont & Tille 2018), maligního gliomu (Zheng *et al.* 2017) a světlobuněčného karcinomu ovária (Li *et al.* 2014) byla v několika studiích pozitivní exprese HNF1B asociována s horší prognózou onemocnění a HNF1B je tak u těchto onemocnění přisuzována role protoonkogenu. Naopak, v případě ductálního adenokarcinomu pankreatu (Janky *et al.* 2016), Wilmsova tumoru ledvin a chromofobního renálního karcinomu (Lebrun *et al.* 2005; Liu *et al.* 2019) výsledky poukazují spíše na tumorsupresorový efekt HNF1B.

Zatímco popisovaný význam HNF1B se u různých nádorů tedy často liší, jedním z konzistentních nálezů je asociace pozitivní exprese HNF1B se světlobuněčným fenotypem (světlobuněčný karcinom ovária, světlobuněčný renální karcinom), vzhledem k tomu, že více než 90 % těchto nádorů vykazuje na proteinové úrovni převážně silnou expresi HNF1B (Kobel *et al.* 2009).

Dosavadní poznatky zatím neumožňují přesně určit a popsat mechanismy, prostřednictvím kterých HNF1B uplatňuje svůj vliv na vývoji a progresi solidních nádorů. Kromě diskutované schopnosti potlačovat či aktivovat epitel-mezenchymální tranzici a tím i vznik invazivních nádorových fenotypů (v některých případech podpořených ko-expresí ERBB2) (Matsui *et al.* 2016) je některými autory také navrhovaná možná asociace HNF1B s kmenovými / progenitorovými buňkami. Několik publikovaných studií předkládá hypotézu, že by se HNF1B mohl podílet na regulaci exprese genů asociovaných s těmito buňkami – HNF1B byl například spojovaný s aktivací genu *CD24* (jež byl recentně identifikovaný jako marker populace renálních progenitorových buněk), osteopontinu (asociovaného s jaterními

progenitory) a genu *CD44* (asociovaného s rakovinnými kmenovými buňkami u různých typů nádorů) (Yu *et al.* 2015a).

#### **1.4. Imunohistochemická exprese HNF1B u vybraných solidních nádorů**

##### **1.4.1. Exprese v karcinomech tlustého střeva**

Na základě dat dostupných v literatuře dosud nebyla imunohistochemická exprese HNF1B u karcinomů tlustého střeva popsána, takže charakteristika expresního profilu těchto lézí s ohledem na HNF1B stále chybí. HNF1B se má přitom zásadním způsobem podílet na terminální diferenciaci a determinaci intestinálních epitelí, kde bylo popsáno, že se společně s HNF1A podílí na přímé regulaci exprese *Jag1* a *Atoh1*, které jsou v regulačních kaskádách nadřazené Notch signální cestě (D'Angelo *et al.* 2010). Možný význam využití IHC exprese HNF1B, zejména s ohledem na možnou prognostickou stratifikaci pacientů, tak zatím není jasný. Stejně tak dosud nebylo popsáno, jakým způsobem by se HNF1B mohl podílet na patogenezi kolorektálního karcinomu, ačkoliv jeho význam z hlediska embryonálního vývoje v této oblasti je nesporný.

##### **1.4.2. Exprese v karcinomech ovária**

Vzhledem k popisované asociaci exprese HNF1B se světlobuněčným fenotypem nádorů byla jeho exprese u karcinomů ovária již studována v řadě prací, které se soustředily především na charakteristiku exprese u světlobuněčného karcinomu. Silně intenzivní exprese je udávána zejména u OCCC, a to do té míry, že HNF1B byl již v roce 2003 označený za první relativně specifický diagnostický imunohistochemický (IHC) marker OCCC (Tsuchiya *et al.* 2003). Asociace HNF1B se světlobuněčným fenotypem byla v literatuře také spojována s možnou derivací ze sekrečního endometria (Cuff *et al.* 2013). Dalším zajímavým poznatkem této studie byla identifikace statisticky významné asociace mezi IHC expresí HNF1B a zvýšeným rizikem klinicky manifestní hluboké žilní trombózy (v případě gynekologických karcinomů bylo riziko

zvýšené 3násobně, v případě kombinované skupiny gynekologických a renálních karcinomů 2.3násobně). Tyto výsledky naznačují, že by HNF1B mohl asociovaný nejen s akumulací glykogenu, ale i s trombózou.

Expres HNF1B byla ale také popsána i u určitého procenta endometroidních karcinomů [5/21 (23.8 %)] a mucinózních karcinomů [6/10 (60 %)] (Huang *et al.* 2016). Jiní autoři popisují expresi HNF1B u většiny typů borderline tumorů ovária (Kato *et al.* 2006). Expres u ostatních typů nádorů je ovšem popisovaná jen jako fokální a slabě (či nejvýše středně) intenzivní, zatímco pro OCCC je typická silná difúzní expres.

### 1.4.3. Expres v nádorech ledvin

HNF1B se zásadním způsobem podílí na správném vývoji renálního tubulárního systému a charakteristika jeho exprese u různých typů nádorů tak má velký význam. Imunohistochemickou analýzou na jedné z nejširších skupin nádorů ledvin se zabývali Szponar *et al.*, kteří hodnotili expresi HNF1B u světlobuněčného renálního karcinomu (ccRCC), chromofobního renálního karcinomu (chRCC), papilárního renálního karcinomu (papRCC), onkocytomu (RO), Wilmsova tumoru, metanefrického adenomu (MA), mucinózního tubulárního a vřetenobuněčného karcinomu (MTSCC) a jejich prekurzorových lézí (Szponar *et al.* 2011). Výsledky IHC analýzy prokázaly silnou difúzní jadernou expresi u 38/67 (56 %) papRCC, 5/5 (100 %) MA a 5/5 (100 %) MTSCC. Silná jaderná pozitivita byla také pozorovaná u prekurzorových lézí (nefrogenních hnízd) asociovaných s papRCC a MTSCC, což naznačuje, že overexpres HNF1B v těchto lézích by mohla vést k opožděné tubulární diferenciaci. Tato snížená úroveň diferenciacie buněk by tak mohla představovat jeden z hlavních faktorů vývoje prekurzorových lézí, které přetrvávají v renálním parenchymu během adultního života a vedou ke vzniku papRCC, MA a MTSCC. Wilmsův tumor byl zcela negativní ve stromálních a blastemálních buňkách, zatímco vyzářující tubuly v blízkosti nefrogenních hnízd byly silně

pozitivní. Naopak nízká exprese HNF1B byla pozorována u RO (které vykazovaly jen izolovanou pozitivitu v 1/18 případů), chRCC (které byly zcela negativní) a překvapivě také u ccRCC, který vykazoval jen ojedinělou jadernou pozitivitu u 7/98 (7 %) případů. V případě světlóuněčného karcinomu je tento výsledek ovšem ojedinělý, neboť většina jiných autorů naopak udává, že pro ccRCC je naprosto typická silná, difúzní exprese HNF1B (Buchner *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013).

#### **1.4.4. Expese v karcinomech prostaty**

Imunohistochemická exprese HNF1B u karcinomu prostaty je prozatím v literatuře popisována velmi sporadicky – na základě extenzivní analýzy byla identifikována pouze jedna studie, která byla na expresi HNF1B u karcinomu prostaty cíleně zaměřená (Debiais-Delpech *et al.* 2014). Její autoři se zabývali vztahem mezi expresí HNF1B a agresivitou a progresí nádorového onemocnění, přičemž jejich výsledky ukázaly, že exprese HNF1B byla významně spojená s proliferací nádorových buněk. Jaderná pozitivita HNF1B byla v porovnání s klinicky lokalizovaným onemocněním signifikantně zvýšená u tkání karcinomu prostaty rezistentního ke kastraci a také u metastatického karcinomu prostaty. U pacientů s klinicky lokalizovaným onemocněním pak byla exprese HNF1B významně asociovaná s proliferací nádorové populace.

Recentně bylo publikováno několik dalších studií, ve kterých byla exprese HNF1B na imunohistochemické úrovni analyzována i jako doplňující analytická metoda u komplexního posouzení mechanického vlivu HNF1B na patogenezi nádorových onemocnění. IHC analýza tak byla provedena například autory Wang *et al.*, kteří u 17 případů metastatického karcinomu prostaty pozorovali výrazně potlačenou, slabou až zcela negativní expresi (Wang *et al.* 2020). Obdobný výsledek popisují i Lu *et al.*, kteří v rámci jejich analýzy zaměřené na vliv HNF1B na buněčnou proliferaci pozorovali obdobně nízkou až zcela negativní expresi u tkání metastatického karcinomu prostaty (Lu *et al.* 2020).

## 2. VYMEZENÍ CÍLŮ PRÁCE

---

Hlavním cílem této práce je komplexní analýza změn HNF1B a jejich vlivu u vybraných solidních nádorů na imunohistochemické i molekulárně biologické úrovni. Imunohistochemická analýza exprese HNF1B je zaměřena především na charakteristiku přítomnosti a typu exprese v jednotlivých studovaných lézích, a dále na možné využití této exprese s ohledem na diferenciální diagnostiku či ovlivnění prognózy některých histologických typů nádorů. Pro všechny výsledky IHC analýz byla také provedena biostatistická analýza s cílem stanovit, zda je mezi expresí HNF1B (a jejími změnami) a vybranými klinicko-patologickými charakteristikami nádorů významný vztah. V rámci biostatistických analýz byly provedeny i analýzy přežití a stanovení prognostického významu HNF1B. Dalším studovaným aspektem je i možné využití exprese HNF1B jako prediktivního markeru s ohledem na možné budoucí terapeutické využití. Analýza genetických a epigenetických změn má význam zejména z hlediska přispění k porozumění, jakou roli hraje HNF1B v patogenezi vybraných solidních nádorů. Posouzení těchto změn má význam zejména jako důležitá informace pro možnou budoucí cílenou terapii.

Jednotlivé hlavní cíle práce tedy byly následující:

1. Analýza exprese HNF1B na imunohistochemické úrovni u benigních a maligních nádorů tlustého střeva, nádorů ledvin, nádorů ovária, a nádorových a nenádorových lézí prostaty. Charakteristika rozsahu a intenzity exprese a její korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nádorů. Zhodnocení možného využití HNF1B v rutinní praxi v rámci diferenciální diagnostiky a jako prognostického markeru.
2. Mutační analýza genu *HNF1B* u všech vybraných nádorových i nenádorových tkání s cílem identifikovat dosud nepopsané somatické patogenní mutace. Posouzení vlivu



vybraných jednonukleotidových polymorfismů *HNF1B* na prognózu studovaných maligních nádorů.

3. Metylační analýza genu *HNF1B* za účelem zhodnocení, jakou roli hraje metylace ve změnách exprese *HNF1B* ve studovaných lézích. Stanovení korelace metylace genu *HNF1B* s proteinovou expresí *HNF1B* (stanovenou imunohistochemicky).
4. Využití získaných výsledků k posouzení, jakou roli hraje *HNF1B* v patogenezi vybraných solidních nádorů.

Výsledky naší práce byly publikovány v článcích uvedených níže.

**publikace s IF, které jsou podkladem práce:**

Bártů, M., Dundr, P., Němejcová, K., Tichá, I., Hojný, H., & Hájková, N. (2018). The Role of *HNF1B* in Tumorigenesis of Solid Tumours: a Review of Current Knowledge. *Folia biologica*, 64(3), 71–83. (IF = 0.691)

Bártů, M., Hojný, J., Hájková, N., Michálková, R., Krkavcová, E., Hadravský, L., Kleissnerová, L., Bui, Q. H., Stružinská, I., Němejcová, K., Čapoun, O., Šlemendová, M., & Dundr, P. (2020). Analysis of expression, epigenetic, and genetic changes of *HNF1B* in 130 kidney tumours. *Scientific reports*, 10(1), 17151. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74059-z>. (IF = 3.998)

Bártů, M., Hojný, J., Hájková, N., Michálková, R., Krkavcová, E., Simon, K., Frýba, V., Stružinská, I., Němejcová, K., & Dundr, P. (2020). Expression, Epigenetic, and Genetic

Changes of HNF1B in Colorectal Lesions: an Analysis of 145 Cases. *Pathology oncology research : POR*, 26(4), 2337–2350. <https://doi.org/10.1007/s12253-020-00830-2>. (IF = 2.826)

Dundr, P., Bártů, M., Hojný, J., Michálková, R., Hájková, N., Stružinská, I., Krkavcová, E., Hadravský, L., Kleissnerová, L., Kopejsková, J., Hiep, B. Q., Němejcová, K., Jakša, R., Čapoun, O., Řezáč, J., Jirsová, K., & Franková, V. (2020). HNF1B, EZH2 and ECI2 in prostate carcinoma. Molecular, immunohistochemical and clinico-pathological study. *Scientific reports*, 10(1), 14365. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71427-7>. (IF = 3.998)

Hojny, J., Bartu, M., Krkavcova, E., Nemejcova, K., Sevcik, J., Cibula, D., Fryba, V., Plincelnerova, L., Dundr, P., & Struzinska, I. (2020). Identification of novel HNF1B mRNA splicing variants and their qualitative and semi-quantitative profile in selected healthy and tumour tissues. *Scientific reports*, 10(1), 6958. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63733-x>. (IF = 3.998)

Němejcová, K., Bártů, M., Hojný, J., Hájková, N., Michálková, R., Krkavcová, E., Stružinská, I., Bui, H.Q., Dundr, P., Cibula, D., Jirsová, K. A comprehensive analysis of the expression, epigenetic and genetic changes of HNF1B and ECI2 in 122 cases of high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncol Lett.* 2021 Mar;21(3):185. doi: 10.3892/ol.2021.12446. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33574924; PMCID: PMC7816296. (IF = 2.311)

### 3. MATERIÁL A METODY

---

#### 3.1. Tkáně

Všechny analýzy byly provedeny na vzorcích tkáně vyšetřovaných v rámci rutinního provozu na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN. Imunohistochemické analýzy byly provedeny na archivních tkáňových bločcích po předchozí fixaci tkáně v 10% roztoku formolu a následném zalití tkáně do parafinu (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE). Pro potřeby molekulárních analýz byly preferenčně využity zmražené tkáňové vzorky (fresh-frozen tissue, FT) uchovávané ve speciálním stabilizačním roztoku RNAlater (Qiagen) při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  dle protokolu výrobce (Stabilization of RNA in Harvested Animal Tissues; Qiagen), deponované v Bance biologického materiálu 1. lékařské fakulty Karlovy univerzity v Praze (BBM) na našem pracovišti. V případech, kdy zmražená tkáň nebyla dostupná, byly molekulární analýzy provedeny na archivních FFPE tkáňových blocích.

Všechny zahrnuté případy byly nejprve podrobeny histopatologické revizi preparátů barvených standardním hematoxylin-eosinovým barvením, během které byla ověřena diagnóza v souladu s aktuálními WHO klasifikacemi jednotlivých podtypů vyšetřovaných nádorů. Zároveň byly vybrány a označeny vhodné oblasti preparátu pro výrobu tkáňových mikročipů (tissue microarray – TMA). Metoda TMA byla preferenčně využita pro provedení imunohistochemického barvení u všech případů, kde bylo k dispozici dostatečné množství reprezentativní tkáně vyšetřovaných lézí. Z každého dárcovského (donor) bločku byla s využitím nástroje TMA Master (3DHISTECH Ltd., Budapešť, Maďarsko) vyvrtána dvě jádra (každé o průměru 2.0 mm), která byla následně použita ke konstrukci složeného tkáňového mikročipu, jež obsahoval celkem 20 jader (z 10 jednotlivých lézí).

Imunohistochemicky bylo celkem analyzováno 516 vzorků nádorové a nenádorové tkáně, které zahrnovaly široké spektrum materiálu pocházejícího z orgánových resekátů, probatorních excízi, polypektomií či jiných diagnostických odběrů. Mutační analýzy byly

úspěšně provedeny u celkem 400 vzorků a analýza metylačního stavu promotoru genu HNF1B u 321 vzorků.

### **3.1.1. Nádorová tkáň**

Vyšetřeno bylo celkem 498 vzorků nádorové tkáně. Mutační analýzy byly úspěšně provedeny u 284 vzorků, metylační analýzy u 266 vzorků. Nádorová tkáň zahrnovala nádory tlustého střeva, nádory ledvin, karcinomy prostaty a karcinomy ovárií.

#### **3.1.1.1. Nádory tlustého střeva**

Celkem jsme vyšetřili 145 nádorů tlustého střeva, které zahrnovaly 105 kolorektálních karcinomů a 40 adenomů. V případě karcinomů byla v BBM dostupná čerstvě zmražená (nádorová a pro některé případy i korespondující nenádorová) tkáň u 78 karcinomů, která byla využita k izolaci nukleových kyselin pro mutační analýzy a analýzy metylace promotoru genu HNF1B. U adenomů nebyla v BBM k dispozici žádná zmražená tkáň a molekulární analýzy tak byly provedeny na celkem 34 vzorcích, kde byla DNA izolována z FFPE tkáňových bloků.

Skupinu adenomů tvořilo celkem 20 adenomů s low grade (LG) dysplastickými změnami epitelu a 20 adenomů s high grade (HG) dysplastickými změnami. Vyšetřované léze se skládaly z několika různých histologických typů adenomu tlustého střeva, přičemž se konkrétně jednalo o:

- 1) tubulární adenomy (celkem 24 případů; 15 x LG, 9 x HG)
- 2) tubulovilózní adenomy (celkem 9 případů; 1 x LG, 8 x HG)
- 3) sesilní serrated adenomy (celkem 3 případy; všechny LG)
- 4) tradiční serrated adenomy (celkem 4 případy; 1 x LG, 3 x HG)

Technika odběru, kterou byly adenomy získány, zahrnovala nejčastěji polypektomií provedenou během endoskopického vyšetření ( $n = 32$ ), ale i hemikolektomií ( $n = 4$ ), parciální kolektomií ( $n = 3$ ) a v jednom případě biopsii z objemného polypu.

Co se týče skupiny karcinomů, všechny zahrnuté případy byly rozděleny podle TNM klasifikace daného nádoru do čtyř skupin dle hloubky invaze do stěny střeva: pT1 (invaze do submukózy;  $n = 10$  případů), pT2 (invaze do tunica muscularis propria;  $n = 30$  případů), pT3 (postižení subserózy nebo šíření do neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáně;  $n = 45$  případů) a pT4 (prorůstání nádoru na viscerální peritoneum či do jiných orgánů a struktur;  $n = 20$  případů) (James D. Brierley 2018). Hodnocené klinicko-patologické parametry u skupiny karcinomů zahrnovaly mimo jiné i „lokalitu“, která byla klasifikována do dvou základních skupin: colon (nádory v appendixu, céku, colon ascendens až colon sigmoideum) a rektum. Histologické typy nádorů zahrnovaly převážně varianty nemucinózních karcinomů ( $n = 94$ ), ale i karcinomy mucinózní ( $n = 11$ ). Parametr „grade“ byl pro statistické zpracování rozdělen do čtyř skupin (G1, G2, G3 a mucinózní), s vyčleněním mucinózních karcinomů do samostatné skupiny, vzhledem k tomu, že grade těchto nádorů závisí na mikrosatelitové instabilitě (podle 4. edice WHO Classification of Tumors of Digestive System) a mikrosatelitový status nebyl dostupný pro všechny zahrnuté karcinomy.

Technika odběru vyšetřovaných karcinomů zahrnovala především resekční chirurgické výkony ( $n = 100$ ; převážně hemikolektomie, parciální kolektomie, amputace rekta a nespecifické resekce), ale v případě pT1 karcinomů se jednalo i o polypektomie ( $n = 5$ ). Klinické sledování v rámci dlouhodobé dispenzarizace (tzv. follow-up) bylo k dispozici u 98 pacientů, přičemž doba sledování sahala od méně než 1 měsíce až po 61 měsíců (medián: 41 měsíců, průměr: 22 měsíců).

### **3.1.1.2. Karcinomy ovária**

Celkem jsme vyšetřili 122 high grade serózních karcinomů (HGSC) ovária. Z celého souboru karcinomů byla v BBM dostupná čerstvě zmražená, korespondující (nádorová a pro některé případy i korespondující nenádorová) tkáň u 58 karcinomů.

Ve vyšetřovaném souboru byly zastoupené karcinomy všech čtyř FIGO stádií a klinický follow-up byl k dispozici u 119 případů. Průměrný věk pacientek v době diagnózy byl 59 let (medián: 60 let; rozsah 36 – 81 let). Hlavní hodnocené parametry nádoru zahrnovaly věk v době diagnózy, FIGO stádium, přítomnost lymfovaskulární invaze, údaje o neoadjuvantní terapii a přítomnost lokální a vzdálené recidivy. Technika odběru vyšetřených karcinomů zahrnovala především bilaterální adnexektomii ( $n = 113$ ), doplněnou o různě rozsáhlý chirurgický výkon tvořený hysterektomií, appendektomií, infrakolickou či totální omentektomií, pánevní a paraaortální lymfadenektomií, unilaterálním či bilaterálním „strippingem“ bránice a parciální či totální pánevní peritonektomií. Ve 3 případech byl nádor odebrán v rámci jednostranné adnexektomie.

### **3.1.1.3. Nádory ledvin**

Celkem jsme vyšetřili 130 nádorů ledvin, mezi které patřilo 121 různých typů karcinomů a 9 benigních nádorů. Spektrum vyšetřených nádorů zahrnovalo:

- 1) světlobuněčný renální karcinom - ccRCC (celkem 93 případů)
- 2) papilární renální karcinom – papRCC (celkem 17 případů)
- 3) chromofobní renální karcinom – chRCC (celkem 11 případů)
- 4) renální onkocytom - RO (celkem 9 případů)

Pro celý tento soubor byla v BBM dostupná čerstvě zmražená (nádorová a pro některé případy i korespondující nenádorová) tkáň u celkem 56 nádorů (42 ccRCC, 2 papRCC, 3 chrRCC, 9 RO).

Klinicko-patologická charakteristika vyšetřovaných případů byla vzhledem k nevyváženému (a v některých případech limitovanému) počtu nádorů v jednotlivých skupinách analyzována pouze pro subset ccRCC. Hlavní hodnocené parametry zahrnovaly stádium nádoru (TNM) a jeho grade u případů, kde byly tyto parametry relevantní (hodnocené na základě 4. vydání WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, a International Society of Urological Pathology), dále lymfovaskulární invazi, přítomnost metastáz, recidivu, pohlaví, a věk pacientů v době diagnózy.

Technika odběru, kterou byly vzorky nádorů získány, zahrnovala buď tumorektomií ( $n = 59$ ) či nefrektomií ( $n = 71$ ). Kompletní resekce (R0) s negativními chirurgickými okraji bylo dosaženo v 96 % (125/130), R1 resekce s pozitivitou chirurgických okrajů byla zaznamenána u 4 % případů (5/130). Klinické sledování v rámci dlouhodobé dispenzarizace bylo k dispozici u 128 pacientů, přičemž doba sledování sahala od méně než 1 měsíce až po 119 měsíců (medián: 42 měsíců, průměr: 42 měsíců).

#### **3.1.1.4. Karcinomy prostaty**

Celkem jsme vyšetřili 101 případů acinárního adenokarcinomu prostaty, z nichž u 55 byla dostupná čerstvě zmražená nádorová tkáň. Párová nenádorová čerstvě zmražená tkáň od stejných pacientů byla k dispozici u 49 případů.

Hlavní hodnocené parametry z hlediska klinicko-patologických charakteristik zahrnovaly věk v době diagnózy, stádium onemocnění, Gleasonovo skóre, přítomnost nádoru v resekčních okrajích (R0 vs. R1 resekce), lymfovaskulární invazi, perineurální invazi, přítomnost vzdálených metastáz, naměřené hodnoty PSA před operací, biochemicky

hodnocenou rekurenci nádoru, metylační stav a přítomnost SNP rs4430796. Všechny případy byly rozděleny do 4 skupin dle TNM klasifikace (T1 – T4) a do 3 skupin v závislosti na dosaženém Gleasonově skóre daného nádoru: low grade nádory (grade skupina 1), nádory intermediárního gradu (grade skupina 2 a 3) a high grade nádory (grade skupina 4 a 5).

Metoda odběru nádorů představovala zejména prostatektomii ( $n = 96$ ), v několika případech se jednalo o materiál získaný z transuretrální resekce prostaty (TURP,  $n = 5$ ). Resekce s negativními chirurgickými okraji bylo dosaženo v 67/101 (66.3 %) případů, pozitivní okraje byly udávány u 34/101 (33.7 %) případů. Klinický follow-up byl k dispozici u 90 pacientů a doba sledování se pohybovala v rozsahu 2 – 94 měsíců.

### **3.1.2. Nenádorová tkáň**

Pro potřeby imunohistochemických či molekulárně genetických vyšetření jsme dále vyšetřili celkem 257 vzorků zahrnujících normální tkáň a nenádorové léze. Tyto vzorky zahrnovaly:

- 1) 87 vzorků nenádorové tkáně tlustého střeva (pro molekulárně genetické analýzy)
- 2) 42 vzorků nenádorové tkáně ledviny (pro molekulárně genetické analýzy)
- 3) 18 vzorků benigní hyperplázie prostaty (pro imunohistochemické vyšetření a molekulárně genetické analýzy)
- 4) 61 vzorků nenádorové tkáně ovária (pro molekulárně genetické analýzy)
- 5) 49 vzorků nenádorové tkáně prostaty (pro molekulárně genetické analýzy)

### **3.2. Imunohistochemické vyšetření**

Imunohistochemické analýzy byly provedeny na celotkáňových řezech či TMA s využitím standardních řezů z FFPE bloků o tloušťce 4  $\mu\text{m}$ , které byly nabarveny pomocí automatizovaného barvicího přístroje Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej,



Švýcarsko). Všechny preparáty byly barveny králičí polyklonální protilátkou proti HNF1B (ředění 1:500, produktové číslo HPA002083, Sigma-Aldrich, Prestige Antibodies, St. Louis, Spojené státy americké). Teplem indukované odkrytí antigenů bylo provedeno v 0.01M citrátovém pufru (pH 6.0). Detekce primární protilátky byla vizualizována prostřednictvím IHC detekčního kitu OptiView DAB (Ventana, Roche). Pouze jaderné zbarvení bylo hodnoceno jako pozitivní, přičemž tato jaderná exprese byla ve všech případech hodnocena nezávisle dvěma patologi v rámci tzv. double blinded odečtu.

Výsledky imunohistochemické analýzy byly hodnoceny na úrovni celkového procenta pozitivních buněk (v rozmezí 0 – 100 %) a zároveň také semikvantitativně, s využitím hodnocení prostřednictvím H-skóre (Specht *et al.* 2015), které umožňuje zahrnout do celkového hodnocení i intenzitu pozorovaného barvení. Za účelem stanovení H-skóre je hodnocen procentuální rozsah positivity na základě intenzity barvení (1+ pro slabou intenzitu, 2+ pro střední, a 3+ pro silnou intenzitu). Celkové H-skóre je poté vypočítáno prostřednictvím součtu násobků jednotlivých intenzit:  $[1 \times (\% \text{ buněk s pozitivitou 1+}) + 2 \times (\% \text{ buněk s pozitivitou 2+}) + 3 \times (\% \text{ buněk s pozitivitou 3+})]$ . Výsledné H-skóre tak dosahuje hodnot v rozmezí 0 – 300.

### 3.3 Biostatistické analýzy

Všechny statistické analýzy v rámci studie byly provedeny s využitím softwaru Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, Spojené státy americké). Ověření normality dat bylo provedeno pomocí Shapiro-Wilkova testu. Vzhledem k nenormální distribuci dat byly pro další analýzy zvoleny neparametrické metody testování.

Za účelem hodnocení vztahu mezi proteinovou expresí HNF1B (H-skóre jako spojitá závislá proměnná) a sledovanými klinicko-patologickými charakteristikami (kategorické proměnné) byl využit neparametrický ANOVA test. V závislosti na počtu analyzovaných kategorií byl zvolen buď Mann-Whitney U-test (dvě kategorie) či Kruskal-Wallis H-test (tři a

více kategorií). V případě použití Kruskal-Wallisova H-testu byly provedeny také *post-hoc* testy (párové testy mnohonásobného porovnávání) za účelem stanovení, které jednotlivé skupiny se liší od ostatních. Pro hodnocení vlivu nezávislých klinicko-patologických charakteristik na hodnoty kategorizovaného H-skóre byl využit Pearsonův chí-kvadrát test nebo Fisherův exaktní test (v závislosti na očekávaných četnostech). Korelace mezi dvěma spojitými proměnnými byly hodnoceny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu.

Pro výpočet analýzy přežití byly použity neparametrické metody odhadu funkce přežití, konkrétně Kaplan-Meierův model s implementovaným log-rank testem, který stanovuje rozdíly mezi jednotlivými křivkami přežití. Jednotlivé hodnocené klinické události zahrnovaly u všech maligních nádorových onemocnění: (1) dobu přežití bez nemoci (disease-free survival, DFS) = doba od data stanovení primární diagnózy do úmrtí na dané onemocnění (pouze pacienti s úmrtím na zkoumanou diagnózu byli považováni za necenzorovaná data), (2) dobu přežití bez lokální recidivy (local recurrence-free survival, LFS) = doba od data stanovení primární diagnózy do data diagnózy první lokální recidivy, a (3) dobu přežití bez vzdálených metastáz (metastasis-free survival, MFS) = doba mezi datem stanovení primární diagnózy a datem diagnózy první vzdálené metastázy. Pokud u pacienta nedošlo k žádné z monitorovaných událostí (DFS / LFS / MFS), byl daný případ v analýze považován za cenzorovaný k datu posledního dostupného záznamu (poslední kontrola). Za datum stanovení primární diagnózy bylo považováno datum potvrzení bioptické diagnózy.

Všechny testy byly oboustranné a za signifikantní byly považovány hodnoty  $p < 0.05$ . Podrobnosti, ve kterých se jednotlivé studie v metodice liší, jsou do detailů rozpracovány v textu příložených publikací, které jsou součástí dizertační práce.

### 3.4. Molekulárně biologické analýzy

Provedené molekulárně biologické analýzy zahrnovaly:

1. mutační analýzu všech kódujících oblastí *HNF1B* (exony 1 – 9, RefSeq NM\_000458.2) s přilehlými intronovými sekvencemi ( $\pm 15$  párů bází, bp) a hlubokými intronovými sekvencemi obsahujícími vybrané jednonukleotidové polymorfismy (rs7527210 a rs4430796 v případě nádorů tlustého střeva, ledvin a prostaty, které byly v případě karcinomů ovária doplněny ještě o rs7405776)
2. epigenetickou analýzu metylace CpG ostrůvků v oblasti *HNF1B* promotoru

Za účelem provedení *HNF1B* mutační analýzy byly využity dva hlavní přístupy v závislosti na původu vyšetřované tkáně. Vysoce kvalitní DNA získaná z FT vzorků byla analyzována prostřednictvím námi navržené dvou krokové polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) a ampliconového sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS). DNA získaná z FFPE bloků byla analyzována s využitím panelové NGS, založené na principu vychytávání cílových oblastí pomocí sond, která zahrnovala všechny kódující sekvence *HNF1B* genu a která je pro zpracování FFPE materiálu vhodnější.

Mutace, které nebyly dosud popsány v literatuře, v Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), v ClinVar Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), nebo v Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC, <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>) byly považovány za nové a dosud neobjevené.

#### 3.4.1. Izolace nukleových kyselin a kontrola kvality

V případě použití FT vzorků byly analyzované tkáně nejprve rozmrazeny a následně bylo 10 – 30 mg dané tkáně homogenizováno s využitím MagNA Lyser Green Beads trubiček v nástroji MagNA Lyser Instrument (Roche) za přítomnosti 600  $\mu$ l RLT Plus pufu (Qiagen)

a 6  $\mu$ l 14.3 M 2-merkaptoetanolu (Sigma-Aldrich). Celkové množství DNA bylo izolováno dle protokolu Simultaneous Purification of Genomic DNA and Total RNA from Animal Tissues s využitím AllPrep DNA Mini kitu (Qiagen). Izolované DNA vzorky byly následně kvantifikovány s využitím nástroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher).

V případě využití tkáňových řezů z archivních FFPE bločků byla DNA získána z 5 – 10 tkáňových řezů (o tloušťce 4 – 5  $\mu$ m) a izolována s využitím automatického izolátoru MagCore® nucleic Acid Extractor, pomocí MagCore Genomic DNA FFPE One-step kitu, Ref MGF-03 (RBC Bioscience). Výsledná izolovaná DNA byla poté kvantifikována pomocí Qubit fluorimetru (Thermo Fisher) a podrobena kontrole kvality amplifikační účinnosti s využitím qPCR (5 ng DNA vzorku bylo amplifikováno pomocí 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix NO ROX; Solis Biodyne). Pouze ty vzorky, které dosáhly požadovaných kritérií kvality ( $C_p < 35$  na 180 bp produktu amplifikace) byly využity pro další analýzy.

### 3.4.2. Příprava amplikonového NGS a sekvenace

Za účelem provedení námi navržené dvou krokové amplikonové PCR bylo sestaveno 15 párů primerů s univerzálními adaptorovými sekvencemi (Tab. 2). Tyto primery byly navrženy tak, aby v prvním kroku PCR pokryly specifické oblasti *HNF1B* genu, včetně hlubokých intronových sekvencí obsahujících varianty rs7527210 a rs4430796. U skupiny HGSC ovárií byla analýza doplněná i o rs7405776, s využitím speciálně navržených primerů (rs7405776\_Forward: agccacagactctagatctgg, rs7405776\_Reverse: caaagtgctgggattataagtgtg).

Ve druhém kroku PCR byl využit univerzální pár primerů obsahující adaptorové sekvence pro Illumina sekvenování. První PCR krok (pokrývající *HNF1B* cílové oblasti) byl proveden ve dvou samostatných multiplexních reakcích. Každá reakce byla provedená s odlišnými páry primerů tak, aby došlo k zamezení nežádoucích interakcí mezi primery. Obě PCR reakce byly amplifikovány s využitím systému FastStart High Fidelity PCR System (Roche) dle standardního doporučeného PCR postupu (FastStart High Fidelity PCR System;

Roche) ve 20  $\mu$ l reakcích dle následujícího protokolu: 2 min – 95 °C; 10 cyklů po 15 s – 95 °C, 20 s – 62 °C a 30 s – 72 °C (pro všechny kroky s uplatněním změny teploty 2 °C/s) a poté 20 cyklů po 15 s – 95 °C, 20 s – 62 °C a 30 s – 72 °C (standartní změna teploty 4 °C/s). Po dokončení prvního PCR kroku bylo odebráno 10  $\mu$ l z obou prvních PCR reakcí, přičemž výsledný produkt byl následně ekvimolárně promísen a purifikován pomocí AMPure XP systému (0,8x; Beckmann Coulter). Takto připravený PCR produkt byl dále amplifikovaný v 10 cyklech ve druhém PCR kroku s využitím stejného protokolu, se standartní změnou teploty a odlišnými primery (obsahujícími adaptorové sekvence pro Illumina sekvenování).

Po dokončení druhého PCR kroku byla stanovena koncentrace výsledných PCR produktů s využitím Qubit fluorimetru (Thermo Fisher) a tyto produkty byly ekvimolárně smíchány do jedné sekvenační knihovny. Připravená sekvenační knihovna byla purifikována prostřednictvím AMPure XP systému (0,8x; Beckmann Coulter) a výsledný produkt byl podroben měření koncentrace (Qubit) a stanovení délky jednotlivých fragmentů s využitím High Sensitivity NGS Fragment Analysis kitu na Fragment Analyzáru (AATI).

Výsledná ampliconová knihovna byla poté sekvenována společně s dalšími (panelovými) knihovnami za účelem zvýšení sekvenační heterogenity. Samotná sekvenace byla provedena buď na 50 vzorcích, které byly sekvenované v rámci jedné ampliconové knihovny pomocí MiSeq 300 cycles v2 kitu, nebo na 90 vzorcích s využitím NextSeq 300 cycles mid output kitu v2.5. Tento sekvenační přístup s využitím ampliconového sekvenování ale vykazoval nízké pokrytí 20 bp na 5' konci exonu 4 ve všech testovaných vzorcích, a tato oblast proto byla dodatečně sekvenována pomocí klasického Sangerova sekvenování s využitím specifického páru primerů (Tab. 3).

Číslo ampliconu	Délka ampliconu (bp)	Jméno primeru	Plná sekvence primeru (5' → 3')	Délka primeru (bp; bez univerzální sekvence)	% pokrytí (bez univerzální sekvence)	T <sub>m</sub> (bez univerzální sekvence)
1	276	HNF1B_NGS_e1F1	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTTAGAAGTTTTCTGACTCCTTTTCG	25	40.0	59.1
		HNF1B_NGS_e1R1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAACTCCTCAAGGCCTGAAC	20	55.0	60.6
2	279	HNF1B_NGS_e1F2	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAAAATGGTGCCAAGCTCAC	21	47.6	59.6
		HNF1B_NGS_e1R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAGGATGGGAGGTGTGCATAGTC	23	52.2	61.5
3	270	HNF1B_NGS_e1F3	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCAAGCCGGTCTTCCACTCT	21	52.4	60.6
		HNF1B_NGS_e1R3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAACGGGCTTGCGAGTGT	18	61.1	64.1
4	247	HNF1B_NGS_e2F	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTAACCATCTGCTTGTCTGTCTAGTG	25	44.0	59.9
		HNF1B_NGS_e2R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTCAGAGGCAGGATGAAAACACTTAC	24	45.8	61.4
5	276	HNF1B_NGS_e3F1	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGCTG	24	54.2	61.6
		HNF1B_NGS_e3R1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTGTAGGCCTGGTACAAGATTGTC	22	50.0	60.0
6	292	HNF1B_NGS_e3F2	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTGTTTCTTTCCAGAGTTCAGTC	25	44.0	60.0
		HNF1B_NGS_e3R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTACTAGTGTCTCAATATCCCAGGACC	25	48.0	61.0
7	264	HNF1B_NGS_e4F1	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGACTGCTGTGATTGTGTGTTTTTG	24	41.7	61.9
		HNF1B_NGS_e4R1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAGAGGGTTCAGGCTGTGAGTC	21	57.1	60.8
8	253	HNF1B_NGS_e4F2	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCACTGAGGTCCGTGTCTACAAC	22	54.5	59.7
		HNF1B_NGS_e4R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAACCCTTAAACCAGATAAGATCCG	24	41.7	60.9
9	251	HNF1B_NGS_e5F	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACTAATGTCCCTACTGGGTTTGTG	25	44.0	61.6
		HNF1B_NGS_e5R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTGTTTTGCCTCTTATCTTATCAGCTC	25	40.0	59.1
10	272	HNF1B_NGS_e6F	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTATCGCTAAGTCACATCGTGTG	22	45.5	60.1
		HNF1B_NGS_e6R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTTGCTTCCCATTCTTCTTCTCC	22	50.0	61.0
11	295	HNF1B_NGS_e7F	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCACCTCTCCTTATCCCAGGAG	21	57.0	58.2
		HNF1B_NGS_e7R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTACTGAGGGTCTGAGTGC	18	61.0	60.4
12	247	HNF1B_NGS_e8F	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTACCTGTGTCTTTGCCTGTGTATG	24	45.8	61.3
		HNF1B_NGS_e8R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAACCTCTGCACATCCATGG	19	52.6	58.7
13	285	HNF1B_NGS_e9F	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGTTGGGCATCATCTCCCTTAG	22	50.0	61.7
		HNF1B_NGS_e9R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTCTCCTGAGAGTGGATTGTCTGAG	23	52.2	60.4
14	269	HNF1B_chr17_rs4430796_F	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAGCGAGAGACCTTCCAAG	20	55.0	60.5
		HNF1B_chr17_rs4430796_R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTTGAGAAGTTTCCAGTCTGCC	21	47.6	59.8
15	250	HNF1B_chr17_rs757210_F	ACACTTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTCACCTCCACACAAGTCAG	20	55.0	61.1
		HNF1B_chr17_rs757210_R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTCATCTAATCTTACGACCGCTCC	23	47.8	60.4

**Tabulka 2.** Seznam genově specifických primerů použitých pro mutační analýzu *HNF1B* ampliconovým NGS s univerzálními adaptorovými sekvencemi (červeně).

Číslo amplikonu	Délka amplikonu (bp)	Jméno primeru	Plná sekvence primeru (5' → 3')	délka primeru (bp)	% genového pokrytí	Tm
1	232	HNF1B e4F	TTGGCCAAGCACCAACAAGTC	21	52.4	58.2
		HNF1B e4R1	CTATAGCTCCAACCAGACTCACAGC	25	52.0	58.5

**Tabulka 3.** Pár primerů použitý pro Sangerovo sekvenování *HNF1B* 5' konce nížce pokrytého exonu 4.

### 3.4.3. Příprava panelové NGS a sekvenace

Vzhledem k charakteru DNA získané z FFPE tkáňových bloků a její nižší kvalitě byla pro sekvenaci tohoto materiálu využita metoda panelové NGS, založená na principu obohacení prostřednictvím vychytávání cílových oblastí pomocí hybridizačních sond.

Jednotlivé vzorky určené pro panelovou NGS byly připraveny pomocí APA HyperPlus kitu dle Seq Cap EZ protokolu (Roche NimbleGen), přičemž cílové genové sekvence byly obohaceny s využitím panelu na zakázku zhotovených SeqCap hybridizačních sond proti vícečetným cílům (257kbp panel cílových genů, NimbleGen, Roche). Samotná sekvenace byla provedena dle postupu detailně popsáno v jedné z našich dřívějších prací (Ticha *et al.* 2019). Aby nedošlo k obohacení homologních sekvencí byly sondy navrženy tak, aby se párovaly pouze s jednou cílovou oblastí. Připravené knihovny byly sekvenovány pomocí nástroje NextSeq 500 (Illumina, San Diego, Kalifornie, Spojené státy americké) s využitím NextSeq 500/550 Mid Output Kitu v2.5 (150 Cycles, Illumina).

### 3.4.4. Biostatistická analýza získaných NGS dat

Základní nezpracovaná data získaná z amplikonového a panelového sekvenování byla demultiplexována, převedena do .fastq formátu a dále analyzována za pomoci NextGEN (Softgenetics) softwaru s využitím stejného základního postupu, který jsme popsali dříve (Ticha *et al.* 2019). Pro potřeby mapování čtení byl použit genom GRCh37 a referenční

transkript NM\_000458.2. Pouze ty vzorky, které dosáhly minimálního pokrytí > 200x (v případě nádorů tlustého střeva, prostaty, ovária, pankreatu) a > 100x (v případě nádorů ledvin) a varianty s frekvencí variantní alely (variant allele frequency, VAF) > 10 % byly použity k dalšímu zpracování a hodnocení.

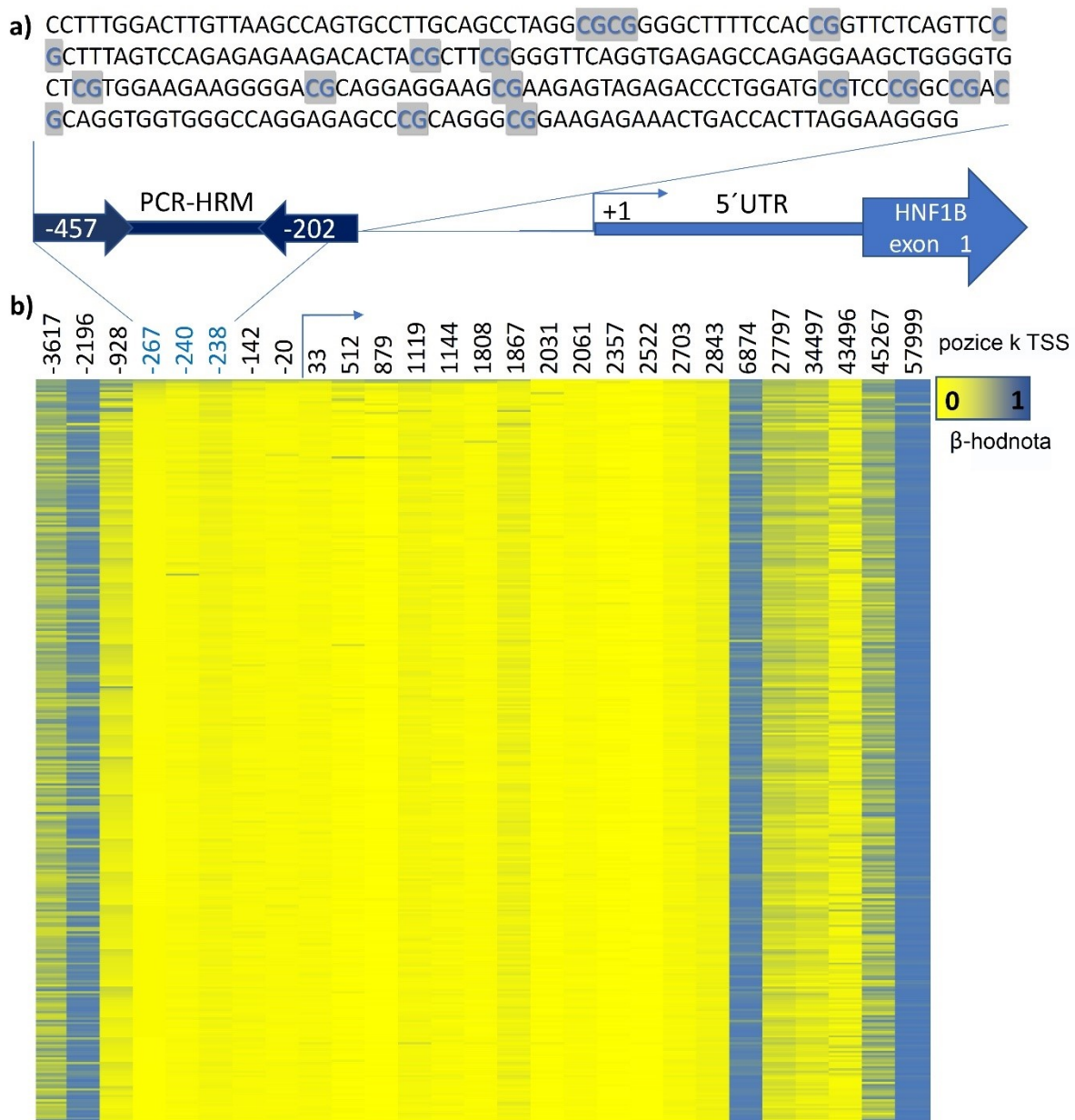
Identifikované varianty byly manuálně prozkoumány pomocí IGV prohlížeče (Broad Institute) za účelem eliminace falešně pozitivních variant, a následně prioritizovány v závislosti na vlivu identifikované mutace. Pouze varianty třídy 3 (varianta neznámého významu), 4 (varianta pravděpodobně patogenní) a 5 (varianta patogenní) jsou uvedeny ve výsledcích níže.

### 3.4.5. Analýza metylace *HNF1B* promotoru

Prvním krokem v rámci analýzy metylace byla bisulfitová konverze DNA, která byla provedena s použitím EZ DNA Methylation-Lightning Kitu (Zymo Research, Irvine, Kalifornie, Spojené státy americké) dle instrukcí výrobce. Metylované i nemetylované alely podstoupily PCR amplifikaci s využitím primerů, jež byly navrženy prostřednictvím Methprimer softwaru (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>): HNF1B\_met\_forward\_TTT TTG GAT TTG TTA AGT TAG TGT TTT, HNF1B\_met\_reverse CCC TTC CTA AAT AAT CAA TTT CTC TT (PCR produkt chr17:36105251-36105506, GrCh37).

PCR amplifikace byla provedena dle následujícího protokolu: 12 min - 95°C, 40 cyklů po 15 s - 95°C, 30 s - 58°C, 30 s - 72°C), zakončeno 5 min - 72°C. Amplifikovaná promotorová oblast *HNF1B* pokrývá celkem 15 CpG ostrůvků (Obr. 3A) a nachází se v úseku -457 až -202 bp, GRCh37, před místem začátku transkripce (transcription start site, TSS). Tato oblast také obsahuje CpG ostrůvek chr17:36105517–36105518, GRCh37, jehož metylace je v literatuře spojena se sníženou expresí *HNF1B* (Shen *et al.* 2013). Po dokončení amplifikace byla provedena analýza křivek tání (melting curve analysis) s použitím nástroje LightCycler 480 II (Roche).





**Obr. 3.** A) Oblast promotoru *HNF1B*, která byla podrobena HRM analýze a která zahrnovala 15 CpG ostrůvků (zvýrazněné šedou barvou). Tato oblast se nachází v úseku -457 až -202 bp GRCh37 před TSS. B) Teplotní mapa znázorňující metylované lokusy *HNF1B* na základě TCGA dat. Každý řádek představuje jeden vzorek nádorové tkáně, každý sloupec představuje jeden z 27 analyzovaných CpG ostrůvků. Čísla nad jednotlivými ostrůvků označují pozici daného CpG ostrůvku vzhledem k TSS genu *HNF1B*. Tři z analyzovaných CpG ostrůvků (znázorněné **modrým** fontem) byly zahrnuté také v naší metylační analýze. Modrá šipka označuje TSS genu *HNF1B*.

V rámci naší práce jsme byli pomocí High Resolution Melting (HRM) analýzy amplifikovaných PCR produktů schopni detekovat nejméně 5 % metylované DNA. Každý jednotlivý běh analýzy obsahoval vzorek konvertované DNA, promísené se sérií 100%, 20%, 10%, 5% a 0% univerzálně metylovaných kontrolních DNA vzorků a nemetylovaných DNA vzorků (Human HCT116 DKO Non-Methylated DNA a Human HCT116 DKOMethylated DNA; Zymo Research). Jednotlivé křivky tání analyzovaných vzorků byly analyzovány pomocí LightCycler 480 II Softwaru a poté porovnány s křivkami tání kontrolních směsí (Wojdacz *et al.* 2008).

#### **3.4.6. Analýza mikrosatelitové instability**

Problematika mikrosatelitové instability (MSI) hraje důležitou roli v patogenezi a progresi kolorektálního karcinomu, kde představuje jeden ze základních molekulárních mechanismů (MSI cesta) vzniku a propagace onemocnění, a také důležitý faktor v rámci klinického rozhodování o výběru adjuvantní terapie (Singh *et al.* 2019). Proto jsme u skupiny kolorektálních karcinomů doplnili u případů kde bylo k dispozici dostatečné množství nádorové tkáně také fragmentační analýzu mikrosatelitové instability, která byla provedena s využitím následujícího souboru pěti kvasimonomorfních mononukleotidových mikrosatelitových markerů: BAT-26, BAT-25, NR-21, NR-22, a NR-24 (Suraweera *et al.* 2002).

Samotná fragmentační analýza byla provedena s pomocí analyzáru ABI 3500 (ThermoFisher). MSI stabilní nádory (microsatellite stable tumors, MSS) nevykazují žádné známky instability, zatímco MSI instabilní nádory (MSI-high nebo MSI-low fenotyp) jsou definované na základě přítomnosti jednoho (MSI-low), nebo dvou a více (MSI-high) nestabilních lokusů.

### 3.4.7. Shromáždění a analýza dat z The Cancer Genome Atlas databáze

The Cancer Genome Atlas program (TCGA, <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>) je významný projekt věnující se problematice nádorové genomiky, jehož náplní je shromáždění dat zahrnujících komplexní molekulární charakteristiku širokého spektra nádorových onemocnění. V současnosti obsahuje TCGA detailní popis více než 20 000 vzorků primárních nádorů a párových nenádorových tkání, zahrnujících 33 různých nádorů. V rámci víceúrovňové komplexní analýzy *HNF1B* jsme v relevantních případech provedli také srovnání našich výsledků s daty získanými z TCGA databáze. TCGA data byla stažena prostřednictvím cBioPortal ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org); TCGA) a zahrnovala především údaje o metylačním stavu CpG ostrůvků, ale také o expresi *HNF1B* na úrovni mRNA, a také vybraná klinicko-patologická data jednotlivých nádorů (rasa, T/N/M stádium, klinické stádium onemocnění, histologický typ tumoru, grade tumoru, lokalita tumoru).

Rozšířená data o metylační analýze všech CpG ostrůvků u *HNF1B* lokusů byla stažena prostřednictvím Mexpress (<https://mexpress.be>) a dále využita pro vizualizaci dat formou teplotní mapy (Obr. 3B). Zatímco naše metylační analýzy byly provedeny metodou HRM, metylační analýza nádorů v TCGA databázi byla provedena s využitím platformy Illumina Infinium Human Methylation 450 K BeadChip. Výsledky metylační analýzy (odhadované úrovně metylace vzorků) jsou v TCGA prezentované jako  $\beta$ -hodnoty, které představují poměr mezi intenzitami metylovaných a nemetylovaných alel ( $\beta$ -hodnoty tak nabývají hodnot od 0 do 1, kde 0 představuje zcela nemetylovanou alelu a 1 představuje plně metylovanou alelu).

Expresi *HNF1B* na úrovni mRNA je v TCGA prezentovaná jako standartní deviace průměrné exprese popsané u referenční populace (všechny vzorky, které jsou z hlediska *HNF1B* lokusu diploidní a vzorky normální, nenádorové tkáně), která je uvedena v podobě mRNA Expression z-Score (RNA Seq V2 RSEM).

## 4. VÝSLEDKY

---

### 4.1. Nádory tlustého střeva

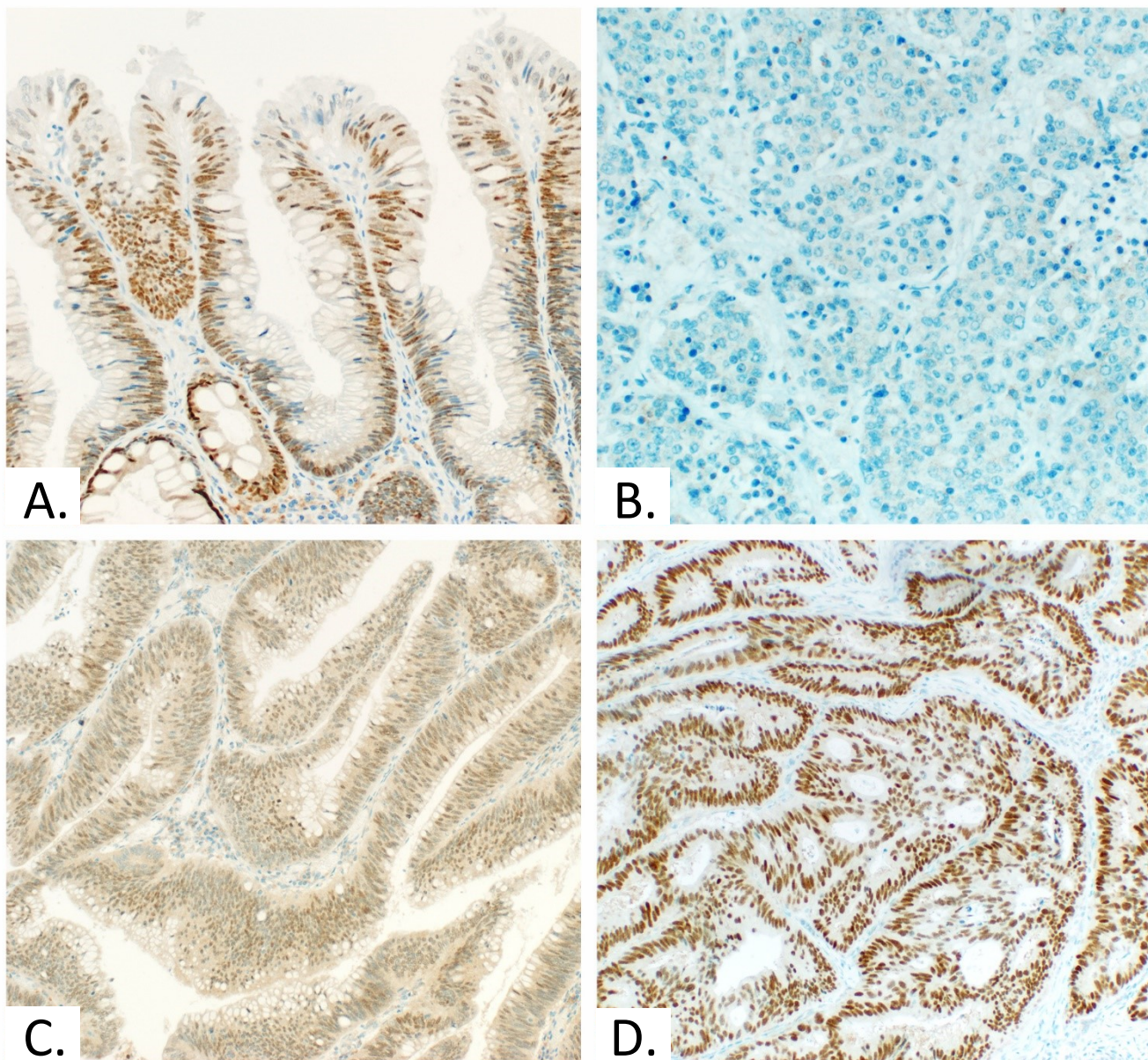
#### 4.1.1. Imunohistochemické vyšetření a biostatistické analýzy

Výsledky imunohistochemického vyšetření ukázaly, že prakticky všechny analyzované případy adenomů i karcinomů tlustého střeva vykazovaly určitou míru homogenní, jaderné exprese HNF1B. Ukázky imunohistochemického vyšetření exprese vyšetřovaných lézí jsou uvedeny na Obr. 4, výsledné hodnoty HNF1B exprese a jejich korelace s klinicko-patologickými charakteristikami jsou shrnuty v Tab. 4 a Tab. 5. Pro potřeby chí-kvadrát testů a biostatistických analýz byly hodnoty H-skóre u všech vyšetřovaných lézí kategorizované do dvou skupin (skupina 1: H-skóre 0–200; skupina 2: H-skóre 201–300).

Co se týče skupiny adenomů, všechny ( $n = 40$ ) vyšetřované případy byly při barvení protilátkou proti HNF1B difúzně převážně silně (či v menším procentu případů středně silně) pozitivní. Při porovnání skupiny adenomů a karcinomů adenomy dosahovaly nejen statisticky významně vyššího rozsahu pozitivní exprese ( $p < 0.001$ ), ale také vyšších hodnot intenzity barvení ( $p < 0.001$ ; Tab. 6).

Biostatistické analýzy ukázaly, že hodnoty H-skóre se statisticky významně nelišily mezi skupinou adenomů s high grade dysplastickými změnami a adenomů s low grade změnami [HG dysplázie H-skóre: 235.8/250 (průměr / medián), LG dysplázie H-skóre: 260.1/257 (průměr / medián)]. Zajímavým nálezem nicméně byly určité změny v expresi HNF1B u adenomů, které vykazovaly převážně low grade dysplastické změny v celé lézi, a jen fokální krátké úseky high grade dysplázie na povrchu léze. V těchto případech bylo patrné, že zatímco LG dysplastické úseky jsou silně difúzně HNF1B pozitivní, povrchové HG partie adenomu vykazují postupně klesající intenzitu exprese (která zůstala zachována, ačkoliv v nižší míře) (Obr. 4A). V případě skupiny adenomů byl dále hodnocen vztah mezi HNF1B expresí a vybranými klinicko-patologickými charakteristikami, které zahrnovaly věk pacienta, pohlaví a

stupeň dysplastických změn. Žádné z těchto charakteristik nevykazovaly u adenomů statisticky významnou souvislost s expresí HNF1B.



**Obr. 4.** Výsledky imunohistochemického barvení protilátkou proti HNF1B u nádorů tlustého střeva. a) Silná jaderná exprese u adenomu s převažující low grade dysplázií epitelu, v povrchových partiích s patrnou sníženou expresí v oblastech s high grade dysplastickými změnami (200x). b) Kompletní ztráta exprese HNF1B u kolorektálního karcinomu (200x). c) Převážně slabá a fokálně středně silná exprese HNF1B u jiného případu kolorektálního karcinomu (100x). d) Kolorektální karcinom vykazující difúzní silnou expresi HNF1B (100x).

**Tabulka 4:** Vztah mezi expresí HNF1B a základními klinicko-patologickými charakteristikami u 40 případů kolorektálních adenomů

Charakteristika	Skupina	n	H-skóre průměr	H-skóre medián	p - hodnota <sup>a</sup>	Exprese HNF1B (n)		p - hodnota <sup>b</sup>
						skupina 1	skupina 2	
Pohlaví	Muž	28	248.3	260	0.712	5	23	0.927
	Žena	12	246.9	250		2	10	
Věk (průměr = 70, median = 73)	<70	14	233.2	243	0.140	2	12	0.694
	≥70	26	255.8	267		5	21	
Stupeň dysplázie	High grade	20	235.8	250	0.129	5	15	0.212
	Low grade	20	260.1	257		2	18	

<sup>a</sup> – hodnoty *p* jsou založeny na výsledcích Mann-Whitney U- testu

<sup>b</sup> – hodnoty *p* jsou založeny na výsledcích Pearsonova chí-kvadrát testu (kategorizovaná exprese)

Skupina karcinomů tlustého střeva vykazovala v porovnání s adenomy významně nižší hodnoty exprese HNF1B (H-skóre průměr 184.5, medián 190;  $p < 0.001$ ) (Tab. 6, Obr. 5). U skupiny karcinomů zahrnovaly hodnocené klinicko-patologické parametry zejména věk pacienta, pohlaví, anatomickou lokalitu nádoru, laterality umístění nádoru, grade nádoru, T/N/M stádium, stádium dle Dukese, pozitivitu lymfatických uzlin, přítomnost lymfovaskulární invaze a perineurální invaze, recidivy, a v případech kde byla tato informace dostupná i MMR status nádoru stanovený imunohistochemickým vyšetřením (Tab. 5). Z těchto parametrů dosáhl statistické významnosti pouze vztah mezi sníženou expresí HNF1B a recidivou ( $p = 0.043$ ) (Obr. 6). Žádné z ostatních charakteristik s expresí HNF1B významně nekorelovaly.

**Tabulka 5.** Vztah mezi expresí HNF1B a klinicko-patologickými charakteristikami u 105 případů kolorektálních karcinomů

Charakteristika	Skupina	n	H- skóre průměr	H- skóre medián	p - hodnota <sup>a</sup>	Exprese HNF1B (n)		p - hodnota <sup>b</sup>
						skupina 1	skupina 2	
<b>Pohlaví</b>					0.267			0.162
	Muž	61	191.7	210		29	32	
	Žena	44	174.5	170		27	17	
<b>Věk</b> (průměr = 71, median = 71)					0.857			0.896
	<71	50	184.5	190		27	23	
	≥71	55	184.5	190		29	26	
<b>Lokalita</b>					0.167			0.325
	Colon	93	188.6	195		48	45	
	Rektum	12	152.9	155		8	4	
<b>Lateralita*</b>					0.410			0.976
	levostr.	54	190.6	190		29	25	
	pravostr.	50	176.7	178		27	23	
<b>Histologický typ</b>					0.781			0.469
	non- mucinózní	94	185.7	192.5		49	45	
	mucinózní	11	175	174.1		7	4	
<b>T stádium</b>					0.221			0.152
	T1	10	216.5	240		3	7	
	T2	30	165.8	165		19	11	
	T3	45	194.9	220		21	24	
	T4	20	173.3	180		13	7	
<b>N stádium</b>					0.791			0.612
	N0	76	188.4	195		39	37	
	N1	17	177.9	180		9	8	
	N2	12	169.2	180		8	4	
<b>M stádium</b>					0.844			0.772
	M0	89	183.8	190		48	41	
	M1	16	188.8	200		8	8	
<b>Dukes staging</b>					0.584			0.436
	A	10	216.5	240		3	7	
	B	50	183.3	178		28	22	
	C	29	173.3	180		17	12	
	D	16	188.8	200		8	8	
<b>Skupina dle TNM stagingu</b>					0.469			0.767
	I	34	175.3	170		20	14	
	II	34	201.8	220		16	18	
	III	21	168.3	180		12	9	
	IV	16	188.8	200		8	8	

<b>Grade</b>					0.097			0.161
	G1	26	204.4	225		11	15	
	G2	59	186.9	190		31	28	
	G3	9	113.1	110		7	1	
	muc.	11	177.1	183		7	5	
<b>Stav lymfatických uzlin</b>					0.498			0.502
	Pozitivní	29	174.3	180		17	12	
	Negativní	76	190.0	200		39	37	
<b>Lymfovaskulární invaze</b>					0.742			0.392
	Ano	41	179.3	180		24	17	
	Ne	64	187.9	203		32	32	
<b>Perineurální invaze</b>					0.363			0.576
	Ano	9	201.7	220		4	5	
	Ne	96	182.9	185		52	44	
<b>MMR status*</b>					0.318			
	deficitní	11	210.0	260		4	7	0.341
	zachovalý	42	190.2	195		22	20	
<b>Recidiva*</b>					<b>0.048</b>			<b>0.019</b>
	Ano	16	147.8	153		13	3	
	Ne	87	189.5	205		43	44	

\* – data nebyla dostupná pro všechny případy

<sup>a</sup> – hodnoty *p* jsou založeny na výsledcích Mann-Whitney U- testu nebo Kruskal-Wallis H- testu

<sup>b</sup> – hodnoty *p* jsou založeny na výsledcích Pearsonova chí-kvadrát testu (kategorizovaná exprese)

**Tabulka 6.** Vztah mezi expresí HNF1B a typem léze u 145 nádorů tlustého střeva

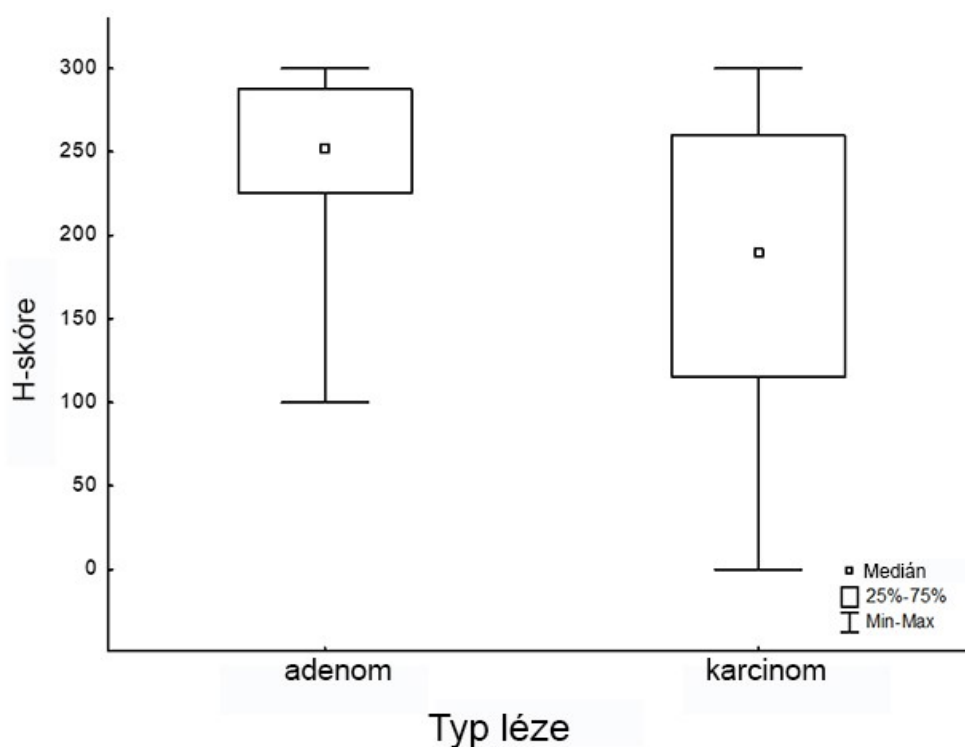
Charakteristika	Skupina	<i>n</i>	H-skóre průměr	H-skóre medián	<i>p</i> - hodnota <sup>a</sup>	Exprese HNF1B ( <i>n</i> )		<i>p</i> - hodnota <sup>b</sup>
						skupina 1	skupina 2	
Typ léze					<b>&lt; 0.001</b>			<b>&lt; 0.001</b>
	Adenom	40	247.9	253		7	33	
	Karcinom	105	184.5	190		56	49	

<sup>a</sup> – hodnoty *p* jsou založeny na výsledcích Mann-Whitney U- testu

<sup>b</sup> – hodnoty *p* jsou založeny na výsledcích Pearsonova chí-kvadrát testu (kategorizovaná exprese)

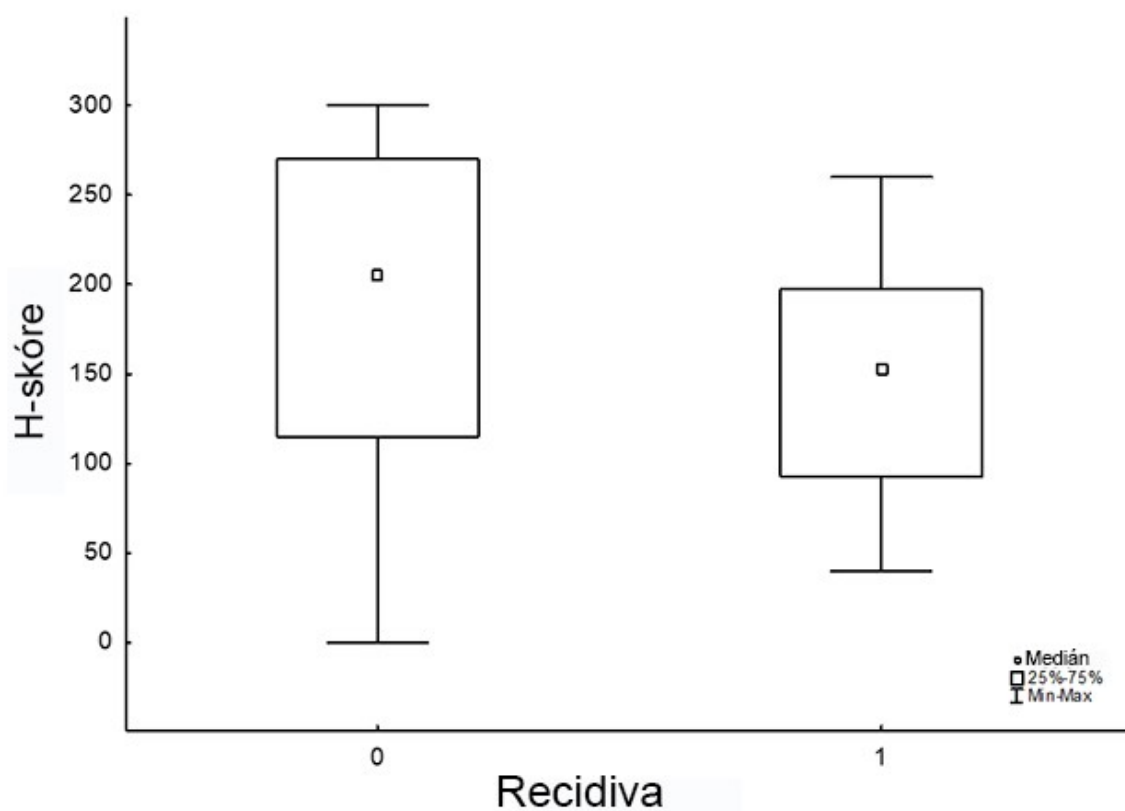


Obdobné analýzy asociace mezi expresí HNF1B (hodnocenou ale na mRNA, ne na IHC úrovni), metylací HNF1B a klinicko-patologickými údaji byly provedeny i na souboru dat kolorektálních karcinomů získaných z TCGA, který pro jednotlivé hodnocené parametry obsahoval 296-372 případů (Tab. 7). Hodnocené klinicko-patologické parametry zahrnovaly rasu, T/N/M stádium, klinické stádium onemocnění, histologický typ tumoru a lokalitu tumoru. Jediný z výsledků, který dosáhl statistického významu, byl vztah mezi expresí HNF1B a histologickým typem karcinomů, kdy mucinózní karcinomy vykazovaly výrazně nižší expresi HNF1B na mRNA úrovni než non-mucinózní karcinomy ( $p = 0.022$ ).

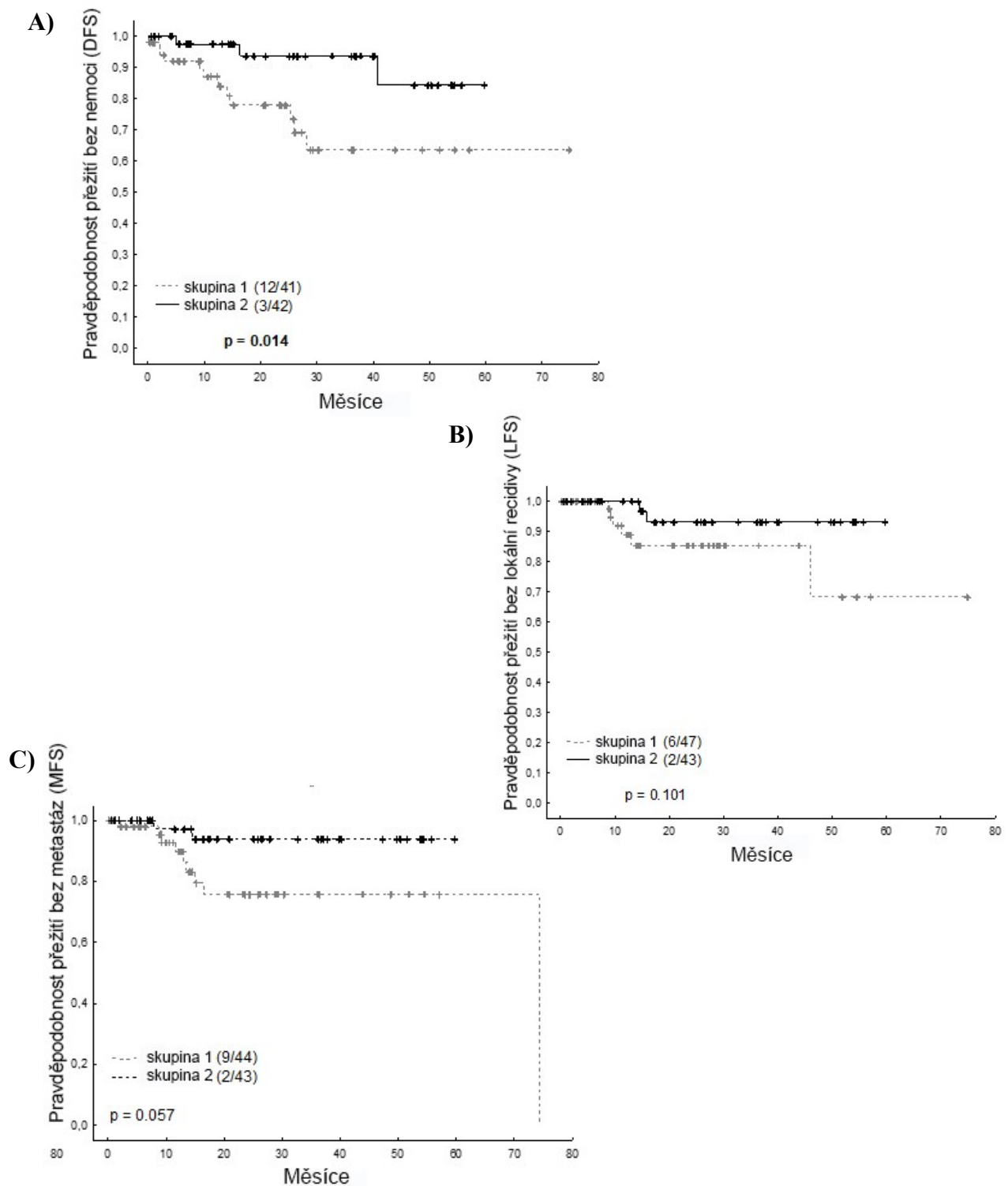


**Obr. 5.** Vztah mezi expresí HNF1B (H-skóre) a typem léze, analýza založena na 145 případech (adenom:  $n = 40$ , karcinom:  $n = 105$ ). Mann-Whitney U test:  $Z = 4.069$ ,  $p < 0.001$

Klinický follow up byl k dispozici u 98/105 karcinomů a tato data byla použita k provedení analýz přežití s ohledem na DFS, LFS a MFS. Výsledky odhalily statisticky významný vztah mezi expresí HNF1B a DFS ( $p = 0.014$ ), kdy byla snižená exprese spojena s horší prognózou a kratším DFS (Obr. 7). Výsledky analýzy dalších dvou parametrů poukázaly pouze na trend naznačující asociaci mezi nižší expresí HNF1B a kratším LFS i MFS, který ale nedosáhl statistické významnosti (LFS  $p = 0.101$ , MFS  $p = 0.057$ ).



**Obr. 6.** Vztah mezi expresí HNF1B (H-skóre) a recidivou onemocnění, analýza založena na 105 případech kolorektálního karcinomu. 0 = bez recidivy, 1 = případy, kdy došlo k recidivě. Mann-Whitney U-test:  $Z = 2.021$ ,  $p = 0.043$



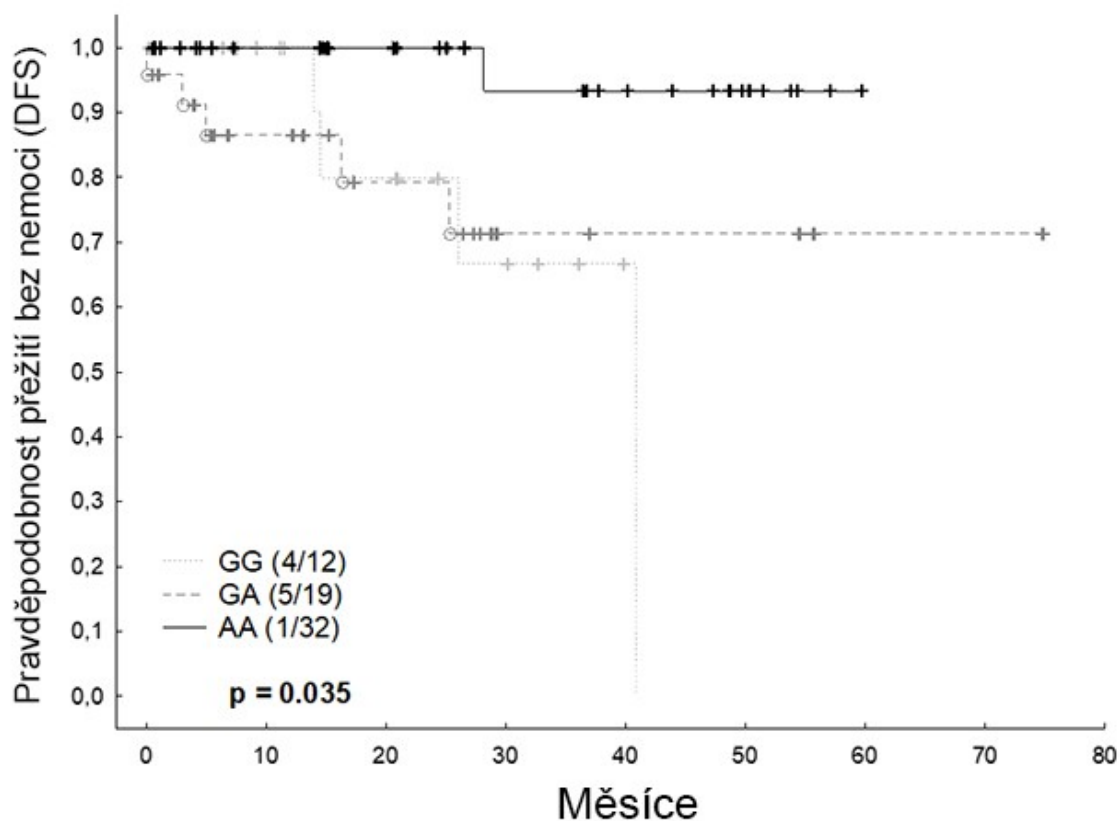
**Obr. 7.** Korelace exprese HNF1B s prognózou. Pravděpodobnost A) přežití bez nemoci (DFS), B) bez lokální recidivy (LFS), a C) bez metastáz (MFS) na základě kategorie H-skóre HNF1B u 98 případů kolorektálního karcinomu. Křivky přežití byly získány s využitím Kaplan-Meierovy metody,  $p$  hodnoty jsou odhadnuty pomocí log-rank testu. Počet úplných/cenzorovaných dat je uveden v závorkách.

#### 4.1.2. Mutační analýza

V případě adenomů tlustého střeva byla mutační analýza úspěšně provedena na 20 případech (z celkového počtu 34 vzorků, pro všechny byl dostupný pouze FFPE materiál). V případě kolorektálních karcinomů byla analýza úspěšná u 84 případů (73 vzorků nádorové tkáně a 11 vzorků korespondující nenádorové tkáně) z celkem 90 případů s dostupným kvalitnějším FT materiálem.

Výsledky analýz ukázaly, že v žádném z vyšetřovaných adenomů nebyly identifikovány žádné mutace třídy 3-5. V případě kolorektálních karcinomů byly mezi 73 případy identifikovány celkem 3 somatické mutace *HNF1B*. Jednalo se o dvě frameshift mutace (vedoucí k posunu čtecího rámce) a jednu nonsense mutaci (vedoucí ke vzniku předčasného stop kodonu a zkráceného proteinového produktu): c.149delC, p.P50LfsTer75 (VAF 38.45 %, dále označována jako Případ A, H-skóre: 210); c.1006delC, p.H336TfsTer40 (VAF 34.88 %, dále označována jako Případ B, H-skóre: 240) a c.554C > T, p.Q182X (VAF 26.79 %, dále označována jako Případ C, H-skóre: 80). Žádné další varianty třídy 3 - 5 (somatické či germinální) nebyly zaznamenány.

Jak již bylo zmíněno výše, v literatuře je kromě vlivu mutací *HNF1B* také diskutován význam jednonukleotidových polymorfismů *HNF1B*, zejména s ohledem na riziko vzniku určitých nádorových onemocnění, přičemž výsledky dosud publikovaných studií jsou často ne zcela jednoznačné či si dokonce protičeří (Elliott *et al.* 2010; Berndt *et al.* 2011; Spurdle *et al.* 2011). Na základě těchto poznatků jsme se v rámci této práce zabývali také hodnocením vlivu dvou nejčastěji popisovaných SNP (rs4430796 a rs7527210) na parametry přežití u kolorektálního karcinomu. V případě SNP rs4430796 bylo pozorováno významně delší DFS u pacientů s genotypem AA, než u pacientů s genotypem GA a GG ( $p = 0.035$ , Obr. 8). Pro SNP rs7527210 nebyl prokázán statisticky významný vliv na přežití ( $p = 0.942$ ).



**Obr. 8.** Korelace genotypu SNP rs4430796 s prognózou. Pravděpodobnost přežití bez nemoci (DFS) ve vztahu ke genotypu rs4430796, na základě 73 případů kolorektálního karcinomu. Křivky přežití byly získány s využitím Kaplan-Meierovy metody,  $p$  hodnoty jsou odhadnuty pomocí log-rank testu. Počet úplných/cenzorovaných dat je uveden v závorkách.

#### 4.1.3. Metylační analýza

Analýza metylace promotoru HNF1B byla úspěšně provedena u celkem 93 případů (72 karcinomů a 21 adenomů) z 99 případů, které byly podrobeny bisulfitové konverzi DNA. V případě adenomů byla metylace promotoru zaznamenána u 1/21 (4.7 %) adenomů, nenádorová tkáň od stejného pacienta za účelem porovnání nebyla v tomto případě k dispozici. V souboru karcinomů byla metylace pozorována u 3/72 (4.2 %) případů. Ve dvou případech se jednalo o nízký stupeň metylace (5–10%, H-skóre těchto karcinomů bylo 30 a 95), zatímco v posledním případě dosáhla metylace střední úrovně (cca 25%, H-skóre = 295).

Korespondující nenádorová tkáň byla k dispozici pro dva z těchto karcinomů a v žádném z případů nebyla metylace zaznamenána. Z celkem 87 vzorků nenádorové tkáně, která byla izolována, byla metylační analýza úspěšně provedena u 61 případů, přičemž žádný z nich metylaci nevykazoval.

Výsledky metylační analýzy provedené na našem souboru byla dále porovnány s daty získanými z TCGA, která byla stažena prostřednictvím portálu Mexpress. Soubor kolorektálních karcinomů získaný z TCGA obsahoval 372 případů s uvedeným T / N / M stádiem, histologickým typem nádoru, lokalitou, stádiem onemocnění a metylačním stavem. Statisticky signifikantní vztah s expresí HNF1B (na úrovni mRNA) byl pozorován ve skupině mucinózních karcinomů, kde byla exprese HNF1B významně nižší.

#### **4.1.4. Analýza mikrosatelitové instability**

Stanovení mikrosatelitové instability metodou fragmentační analýzy bylo úspěšně provedeno u 103/105 případů karcinomů (u zbývajících 2 případů nebylo na tuto analýzu již k dispozici dostatečné množství nádorové tkáně). Výsledky ukázaly, že 81/103 karcinomů bylo MSS, 2/103 karcinomů byly MSI-low a 20/103 karcinomů byly MSI-high. Oba dva případy, které fragmentační analýza vyhodnotila jako MSI-low, byly dodatečně podrobeny imunohistochemickému vyšetření s použitím protilátek proti mismatch-repair proteinům (MSH2, MSH6, MLH1, PSM2). Ty vykazovaly zachovalou IHC expresi, a proto byly pro potřeby statistických analýz tyto případy přiřazeny do MSS skupiny nádorů. Biostatická analýza neprokázala žádnou statisticky významnou asociaci mezi expresí HNF1B a těmito dvěma (MSS versus MSI-high) skupinami (Tab. 5).

**Tabulka 7:** Vztah mezi expresí HNF1B na úrovni mRNA a metylací a klinicko-patologickými charakteristikami u souboru kolorektálních karcinomů z TCGA

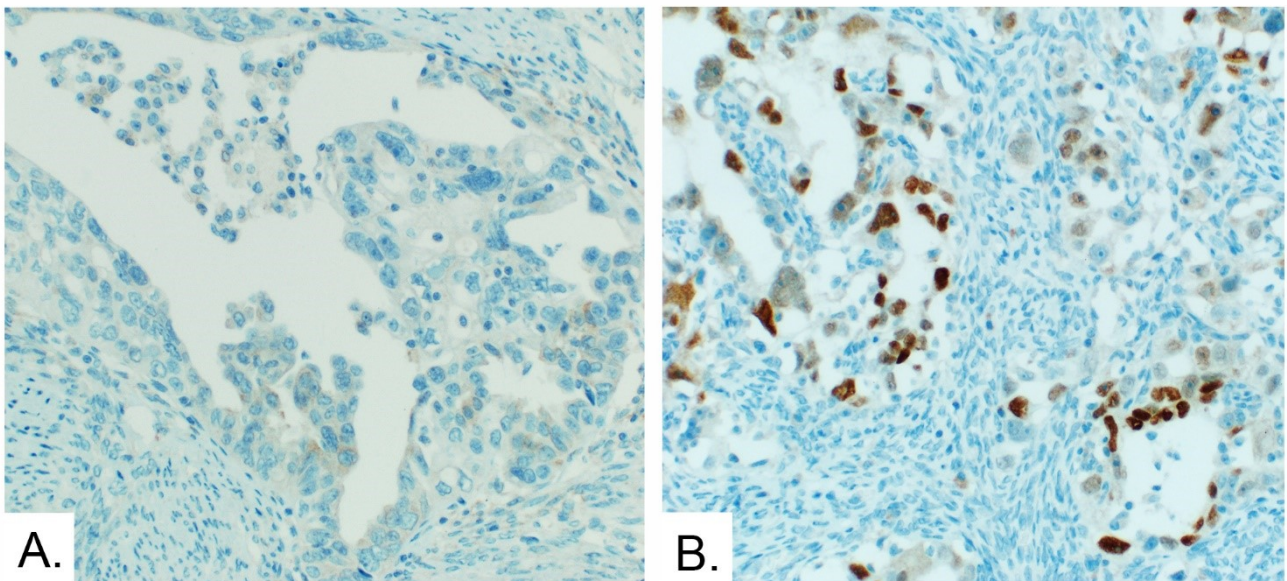
Charakteristika	Skupina	<i>n</i>	mRNA exprese z-skóre průměr	mRNA exprese z-skóre medián	<i>p</i> - hodnota	B - hodnota průměr	B - hodnota medián	<i>p</i> - hodnota
<b>Rasa*</b>					0.447			0.497
	bělošská	284	0.167	0.059		0.036	0.025	
	černošská	61	0.046	-0.084		0.042	0.026	
<b>T stadium*</b>					0.149			<b>0.002</b>
	T1	10	0.412	0.319		0.047	0.319	
	T2	53	0.235	0.159		0.032	0.025	
	T3	48	0.142	0.062		0.036	0.025	
	T4	255	-0.165	-0.208		0.058	0.031	
<b>N stadium*</b>					0.237			0.600
	N0	200	0.117	0.125		0.036	0.025	
	N1	97	0.270	0.009		0.037	0.025	
	N2	68	-0.058	-0.218		0.035	0.027	
<b>M stadium*</b>					0.709			0.779
	M0	246	0.111	0.023		0.033	0.023	
	M1	50	0.044	-0.07		0.042	0.026	
<b>stadium onemocnění*</b>					0.743			0.863
	I	54	0.219	0.186		0.035	0.026	
	II	132	0.068	0.102		0.038	0.026	
	III	112	0.166	-0.048		0.035	0.025	
	IV	51	0.035	-0.084		0.041	0.026	
<b>histologický typ</b>					<b>0.022</b>			0.295
	non-muc. karcinom	332	0.178	0.082		0.034	0.025	
	muc. karcinom	40	-0.243	-0.221		0.058	0.026	
<b>lokalita tumoru*</b>					0.100			0.278
	colon	311	0.166	0.071		0.035	0.025	
	rektum	40	-0.088	-0.125		0.041	0.027	

\* data nebyla dostupná pro všechny případy

## 4.2. Karcinomy ovária

### 4.2.1. Imunohistochemické vyšetření a biostatistické analýzy

Imunohistochemická analýza byla provedena u všech 122 případů HGSC a její výsledky ukázaly, že jaderná IHC exprese HNF1B byla obecně velmi nízká (H-skóre průměr: 21.8; H-skóre medián: 0). Pozitivita HNF1B byla pozorována pouze u 28 případů (u 15 případů byly hodnoty H-skóre v rozmezí 20 – 99, u 13 případů v rozmezí 100 - 200), přičemž zbytek případů ( $n = 94$ ) byl zcela negativní (H-skóre 0). V případech, kde byla pozitivita HNF1B přítomna, se jednalo převážně o slabou až středně silnou intenzitu barvení. U celkem 17/28 případů byla intenzita HNF1B barvení fokálně silná, ale rozsah takto pozitivních nádorových buněk v žádném z případů nepřekročil 30 % z celého nádoru. Žádný z HGSC nedosáhl hodnot H-skóre nad 200. Reprezentativní příklady výsledků IHC analýzy jsou uvedeny v Obr. 9.

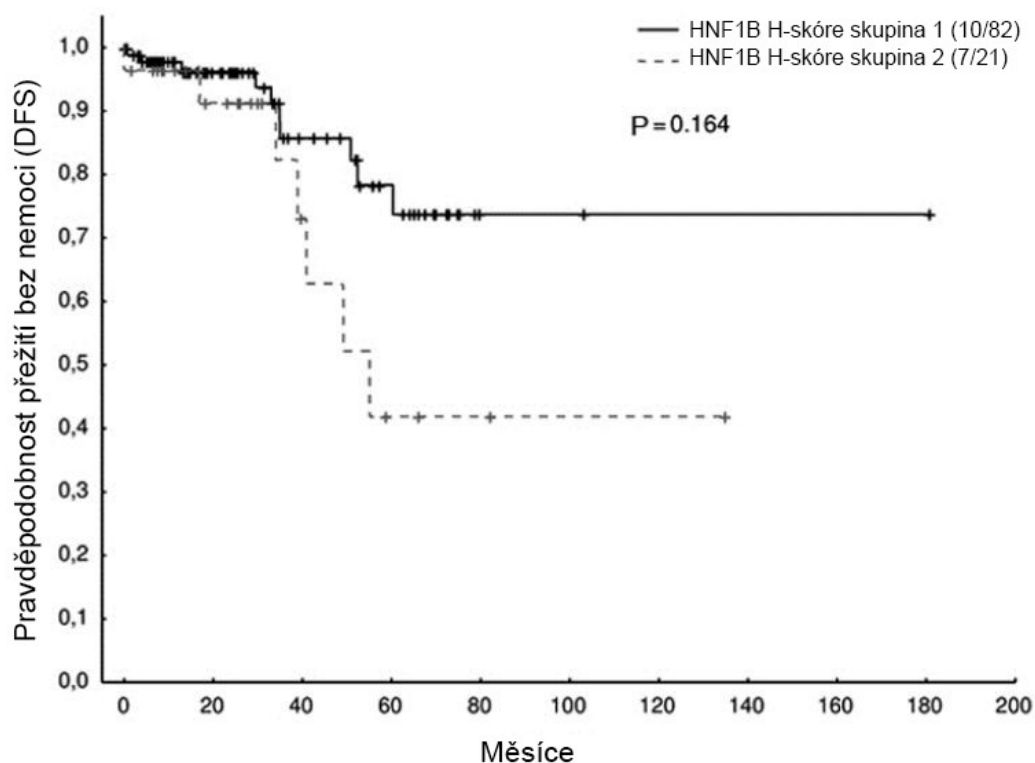


**Obr. 9.** Příklady imunohistochemického barvení protilátkou proti HNF1B u HGSC ovária. A) Kompletní negativita jaderné exprese HNF1B v nádorových buňkách (200x). B) Fokální variabilně intenzivní exprese HNF1B (středně silná až silná) (200x).



Pro potřeby chí-kvadrát testů a analýz přežití byly hodnoty H-skóre u všech případů kategorizovány do dvou skupin s ohledem na medián dosažených hodnot (skupina 1: H-skóre 0–19; skupina 2: H-skóre 20–300). Biostatistické analýzy prokázaly, že vyšší exprese HNF1B byla pozitivně asociována s lymfovaskulární invazí ( $p = 0.025$ ) (Tab. 8). Pro žádný z dalších testovaných klinicko-patologických parametrů nebyl prokázán statisticky významný vztah s expresí HNF1B.

Analýzy přežití v závislosti na expresi HNF1B byly provedeny pro všechny tři sledované parametry (DFS, LFS, MFS) a výsledky pro žádný z parametrů nedosáhly statistické významnosti. Pro DFS byl nicméně pozorován trend naznačující asociaci mezi nižší expresí HNF1B a vyšší pravděpodobností delšího DFS (Obr. 10).



**Obr. 10.** Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti přežití bez nemoci v závislosti na kategorizované expresi HNF1B (H-skóre). HNF1B skupina 1: H-skóre 0-19; skupina 2: H-skóre 20-300.

**Tabulka 8.** Vztah mezi expresí HNF1B (H-skóre) a klinicko-patologickými charakteristikami u 122 případů HGSC

Charakteristika	<i>n</i>	H-skóre průměr	H-skóre medián	<i>p</i> - hodnota	H-skóre skupina 1	H-skóre skupina 2	<i>p</i> - hodnota
<b>Věk (průměr = 59, medián = 60)</b>				0.094 <sup>b</sup>			0.273 <sup>c</sup>
<60	59	13.8	0		48	11	
≥60	63	29.3	0		46	17	
<b>FIGO<sup>a</sup></b>				0.953 <sup>b</sup>			0.676 <sup>c</sup>
I	10	27.6	0		7	3	
II	7	18.6	0		6	1	
III	83	22.5	0		62	21	
IV	20	19.2	0		17	3	
<b>Lymfovaskulární invaze</b>				0.025 <sup>b</sup>			0.023 <sup>c</sup>
Ano	63	27.7	0		45	18	
Ne	28	8.6	0		26	2	
<b>Neoadjuvantní terapie</b>				0.607 <sup>b</sup>			0.768 <sup>c</sup>
Ano	28	24.4	0		21	7	
Ne	94	20.9	0		73	21	
<b>Lokální recidiva<sup>a</sup></b>				0.261 <sup>b</sup>			0.734 <sup>c</sup>
Ano	55	16.8	0		42	13	
Ne	49	29.5	0		36	13	
<b>Vzdálená recidiva<sup>a</sup></b>				0.087 <sup>b</sup>			0.651 <sup>c</sup>
Ano	52	15.8	0		40	12	
Ne	52	30.1	0		38	14	
<b>Metylace<sup>a</sup></b>				0.056 <sup>b</sup>			0.089 <sup>c</sup>
Ano	26	12.3	0		23	3	
Ne	41	21.6	0		29	12	
<b>rs4430796<sup>a</sup></b>				0.993 <sup>b</sup>			0.535 <sup>d</sup>
Ano	44	20.4	0		35	9	
Ne	21	13.9	0		15	6	
<b>rs757210<sup>a</sup></b>				0.613 <sup>b</sup>			0.476 <sup>d</sup>
Ano	52	17.9	0		41	11	
Ne	13	19.8	0		9	4	
<b>rs7405776<sup>a</sup></b>				0.071 <sup>b</sup>			0.115 <sup>d</sup>
Ano	44	24.8	0		31	13	
Ne	21	5.0	0		19	2	

<sup>a</sup> Data nebyla dostupná pro všechny případy; <sup>b</sup> *p* – hodnoty jsou založeny na výsledcích Mann-Whitney U-testu nebo Kruskal-Wallisova H-testu; <sup>c</sup> *p* – hodnoty jsou založeny na výsledcích Pearsonova chí-kvadrát testu; <sup>d</sup> *p* – hodnoty jsou založeny na výsledcích Fisherova exaktního testu. Expresie HNF1B je kategorizována do 2 skupin: skupina 1 (H-skóre 0-19) a skupina 2 (H-skóre 20-300).

#### 4.2.2. Mutační analýza

Mutační analýza genu *HNF1B* byla úspěšně provedena u 61 FT vzorků nádorové tkáně. U jednoho z analyzovaných případů [1/61 (1.6 %)] byla identifikována somatická nonsense mutace NM\_000458.2: c.1063C>T, p.(Q355X) s frekvencí variantní alely 68 %. Tento případ byl zcela negativní v imunohistochemickém průkazu HNF1B (H-skóre: 0).

Žádný z analyzovaných SNP (rs4430796, rs7527210, rs7405776) nebyl signifikantně asociovaný s IHC expresí HNF1B (Tab. 8) či s metylací promotoru *HNF1B* (Tab. 9).

#### 4.2.3. Metylační analýza

Analýza metylace promotoru genu *HNF1B* byla úspěšně provedena u 67 FT vzorků nádorové tkáně. Metylace promotoru *HNF1B* byla detekována u 26/67 (38.8 %) případů, přičemž dle biostatistických analýz nebyl metylační status významně asociovaný se žádným ze sledovaných klinicko-patologických parametrů (Tab. 9).

Výsledky metylační analýzy provedené na našem souboru nádorů byla také porovnány s daty získanými z TCGA, která byla stažena prostřednictvím portálu Mexpress. Soubor nádorů získaný z TCGA zahrnoval 569 případů označených jako „serózní cystadenokarcinom“ s uvedeným stádiem, gradem a metylačním stavem. Metylační stav byl získán s využitím lokusu cg12788467 (pozice relativní k TSS je -238, GRCh37), který byl také zahrnut v námi analyzované oblasti promotoru. Tento lokus byl označen jako hypermetylovaný v případě, že jeho  $\beta$  hodnota přesáhla 0.3 (Cancer Genome Atlas Research 2015). Na základě těchto kritérií byla metylace promotoru *HNF1B* zaznamenána u 315/569 (55 %) případů.

**Tabulka 9.** Vztah mezi metylací promotoru *HNFI*B a vybranými klinicko-patologickými charakteristikami u 67 případů HGSC.

Charakteristika	Metylace Ano	Metylace Ne	<i>p</i> – hodnota
Věk			0.307
<60	16	20	
≥60	10	21	
FIGO <sup>a</sup>			0.714
I	1	4	
II	2	3	
III	17	27	
IV	6	6	
Lymfovaskulární invaze <sup>a</sup>			0.778
Ano	12	26	
Ne	5	9	
Neoadjuvantní terapie			0.478
Ano	5	11	
Ne	21	30	
Lokální recidiva <sup>a</sup>			0.252
Ano	14	19	
Ne	6	16	
Vzdálená recidiva <sup>a</sup>			0.878
Ano	11	20	
Ne	9	15	
rs4430796 <sup>a</sup>			0.615
Ano	16	28	
Ne	9	12	
rs757210 <sup>a</sup>			0.524
Ano	19	33	
Ne	6	7	
rs7405776 <sup>a</sup>			0.614
Ano	16	28	
Ne	9	12	

<sup>a</sup>Data nebyla dostupná pro všechny případy.

*P* – hodnoty jsou založeny na výsledcích Pearsonova chí-kvadrát testu.

### 4.3. Nádory ledvin

#### 4.3.1. Imunohistochemické vyšetření a biostatistické analýzy

Výsledky imunohistochemické analýzy ukázaly, že mezi všemi čtyřmi typy analyzovaných nádorů ledvin byly významné rozdíly v rozsahu a intenzitě IHC exprese HNF1B ( $p < 0.001$ ). Dosažené úrovně exprese u jednotlivých typů nádorů hodnocené prostřednictvím H-skóre jsou uvedené v Tab. 10.

**Tabulka 10:** Vztah mezi expresí HNF1B a typem nádoru u 130 případů renálního karcinomu

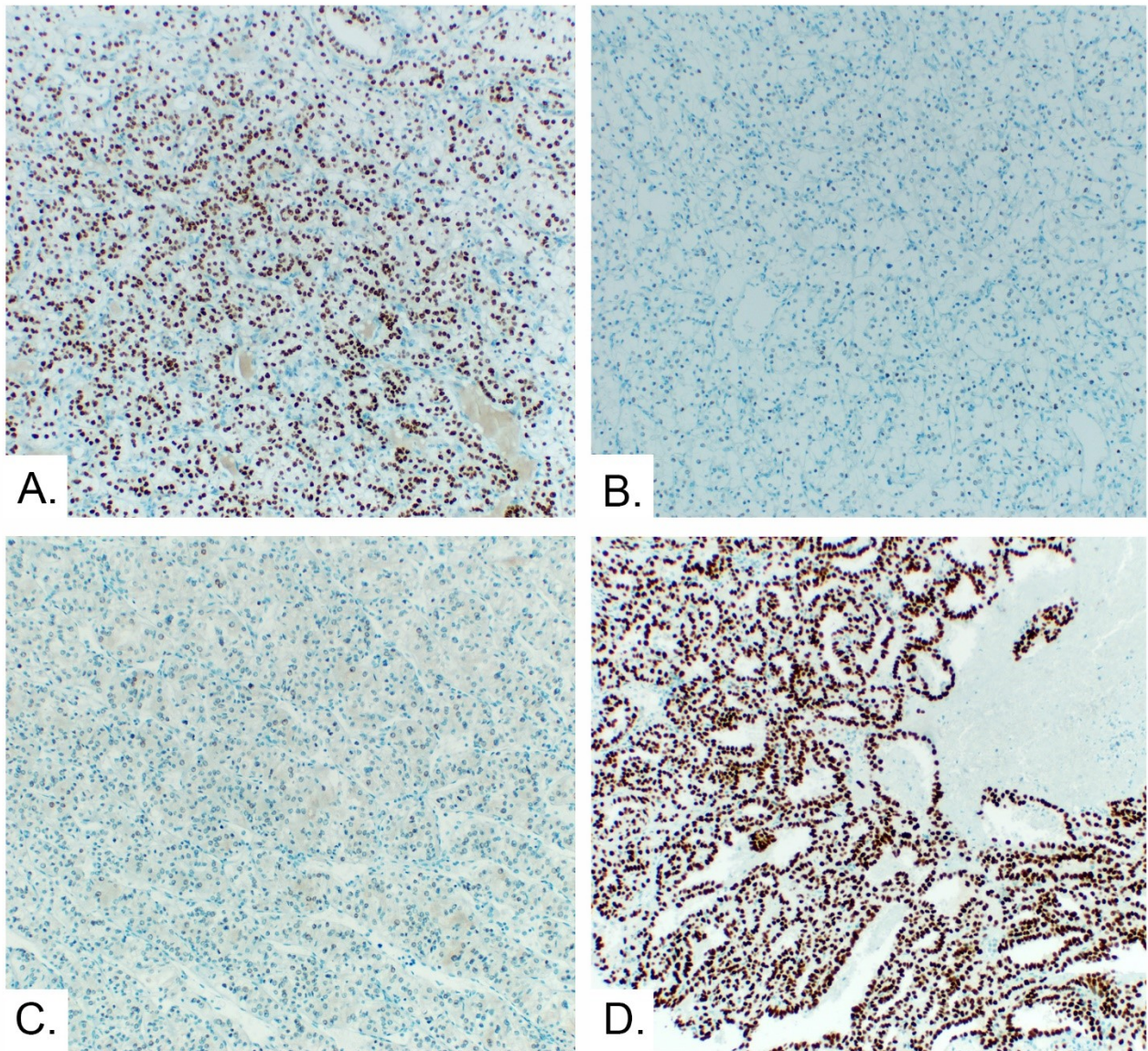
Skupina	<i>n</i>	H-skóre průměr	H-skóre medián	<i>p</i> - hodnota <sup>a</sup>	kategorizované H-skóre			<i>p</i> - hodnota <sup>b</sup>
					skupina 1	skupina 2	skupina 3	
Diagnóza				<b>&lt; 0.001</b>				<b>0.004</b>
ccRCC	93	201.3	250		22	18	53	
chRCC	11	35.5	0		9	2	0	
papRCC	17	201.8	270		5	3	9	
RO	9	162.2	170		3	3	3	

ccRCC – světlóbuňčný renální karcinom, chRCC – chromofobní renální karcinom, papRCC – papilární renální karcinom, RO – renální onkocytom

<sup>a</sup> – *p* - hodnoty jsou založené na výsledcích Mann-Whitney U-testu nebo Kruskal-Wallis H-testu

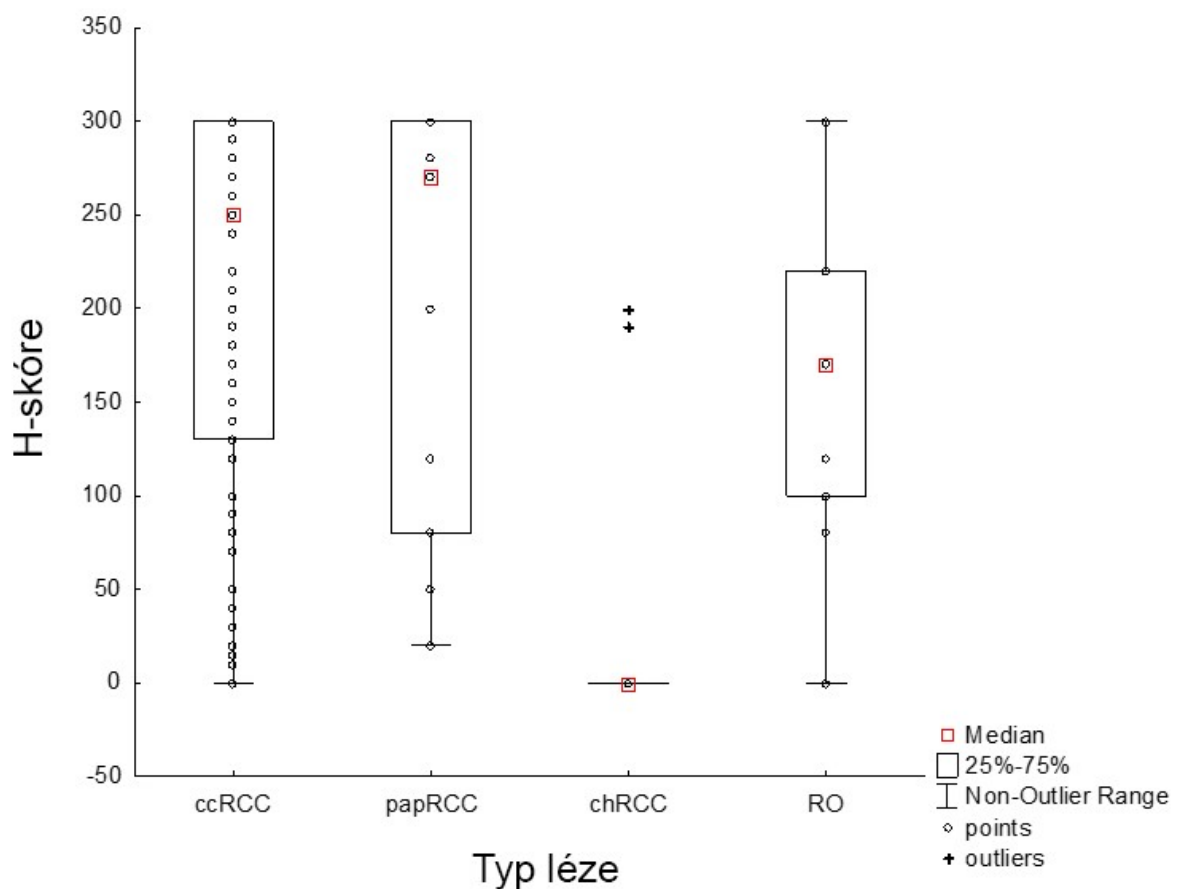
<sup>b</sup> – *p* – jsou založené na výsledcích Pearsonova chí-kvadrát testu (kategorizovaná exprese)

Ve skupině ccRCC, papRCC a RO vykazovaly prakticky všechny případy určitou úroveň homogenní, jaderné positivity HNF1B, zatímco téměř všechny nádory ze skupiny chRCC byly zcela negativní (s výjimkou pouze dvou případů, kdy byla pozorována slabá až středně silná pozitivita). Reprezentativní příklady výsledků IHC barvení s protilátkou proti HNF1B jsou uvedené v Obr. 11.



**Obr. 11.** Příklady výsledků imunohistochemického barvení protilátkou proti HNF1B u nádorů ledvin. A) Difúzní silná jaderná pozitivita HNF1B u ccRCC (100x). B) Ojedinelá slabá pozitivita exprese HNF1B a převažující kompletní negativita u jiného případu ccRCC (100x). C) Ojedinelá slabá pozitivita exprese HNF1B a převažující kompletní negativita u chRCC (100x). D) Difúzní silná jaderná pozitivita u papRCC (100x).

Vzhledem k zaznamenaným rozdílům v IHC expresi mezi jednotlivými typy nádorů ledvin byly provedeny *post-hoc* testy, které ukázaly na statisticky významné rozdíly zejména mezi skupinou chRCC a ccRCC ( $p < 0.001$ ) a také mezi skupinou chRCC a papRCC ( $p < 0.001$ ). Mezi skupinou RO a ostatními typy nádorů nebyl prokázán významný rozdíl. Rozdílné výsledky exprese HNF1B u jednotlivých typů nádorů jsou znázorněné v Tab. 10 a Obr. 12, kde je také zvýrazněn nerovnoměrný počet případů v jednotlivých skupinách.



**Obr. 12.** Rozdílná exprese HNF1B (H-skóre) ve vztahu k jednotlivým typům nádorů ledvin. Analýza je založena na 130 případech renálního karcinomu (ccRCC:  $n = 93$ , chRCC:  $n = 11$ , papRCC:  $n = 17$ , RO:  $n = 9$ ). Kruskal-Wallisův H-test:  $H(3,130) = 21.96, p < 0.001$ . Jeden bod v grafu může představovat více než jeden případ.

Vzhledem k nerovnoměrnému počtu případů v jednotlivých skupinách nádorů (a v některých případech také k jejich limitovanému počtu) byla dále analyzovaná asociace mezi expresí HNF1B a klinicko-patologickými charakteristikami pouze pro tu nejpočetnější skupinu nádorů ledvin – ccRCC ( $n = 93$ ). Pro potřeby chí-kvadrát testů byly hodnoty H-skóre u všech případů kategorizovány do celkem tří skupin (skupina 1: H-skóre 0–100; skupina 2: H-skóre 101–200; skupina 3: H-skóre 201–300).

Výsledky analýz jsou shrnuty v Tab. 11. Exprese HNF1B byla signifikantně asociovaná s gradem nádorů ( $p = 0.002$ ), kdy nižší exprese HNF1B korelovala s vyšším gradem nádoru. Následně doplněné *post-hoc* testy pro znázornění rozdílů mezi jednotlivými skupinami ukázaly tyto výsledky: G1 vs. G2 ( $p = 0.032$ ), G1 vs. G3 ( $p = 0.019$ ), G1 vs. G4 ( $p = 0.025$ ), G2 vs. G3 ( $p > 0.05$ ), G2 vs. G4 ( $p > 0.05$ ), G3 vs. G4 ( $p > 0.05$ ) (Obr. 13). Výsledky pro žádný z dalších hodnocených parametrů (věk, pohlaví, T stádium nádoru, přítomnost lymfovaskulární invaze, metastáz, recidivy, přítomnost specifických SNP *HNF1B*) nedosáhly statistické významnosti. Zajímavým zjištěním byl nicméně fakt, že při porovnání nádorů v T1a (nádor o velikosti do 4 cm včetně) a T1b stádiu (nádor větší než 4 cm, ale menší než 7 cm) byl pozorován významný rozdíl v dosažených hodnotách H-skóre mezi těmito dvěma skupinami (vzhledem k nízkému počtu případů ve vyšších T stádiích by nebylo zahrnutí těchto stádií do analýz racionální). Nádory ve skupině T1a vykazovaly vyšší expresi HNF1B než nádory ve skupině T1b (pT1a: průměr = 235.8, medián = 280; pT1b: průměr = 181.0, medián = 185,  $p = 0.046$ ).

Vzhledem k tomu, že v početně největší skupině nádorů ccRCC bylo zaznamenáno celkem pouze 8/93 případů lokální či vzdálené recidivy onemocnění by analýzy přežití neposkytly statisticky relevantní výsledky a nebyly proto provedeny.



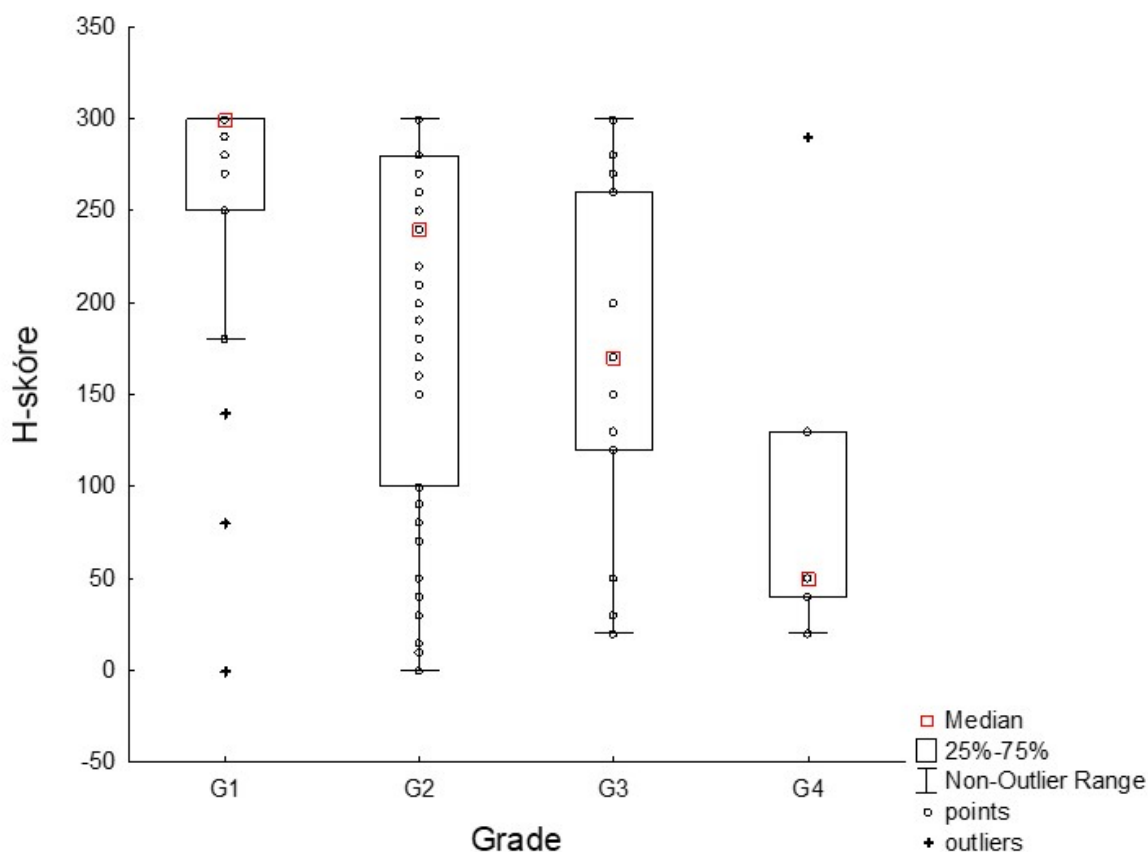
**Tab. 11:** Vztah mezi expresí HNF1B a klinicko-patologickými charakteristikami u 93 případů ccRCC

Charakteristika	Skupina	n	H-skóre průměr	H-skóre medián	p- hodnota <sup>a</sup>	kategorizované H-skóre			p- hodnota <sup>b</sup>
						skupina 1	skupina 2	skupina 3	
Pohlaví	Muž	54	198.2	240	0.617	12	13	29	0.399
	Žena	39	205.8	250		10	5	24	
Věk (průměr = 63, medián = 65)	< 65	44	198.9	240	0.849	8	8	28	0.414
	≥ 65	49	203.5	260		14	10	25	
pT klasifikace	pT1	70	212.4	265	0.094	15	11	44	0.360
	pT2	6	141.7	145		2	2	2	
	pT3	17	177.1	170		5	5	7	
Grade	G1	22	255.5	300	<b>0.002</b>	2	2	18	<b>0.012</b>
	G2	53	196.1	240		14	9	30	
	G3	13	167.7	170		3	6	4	
	G4	5	106.0	50		3	1	1	
Lymfovaskulární invaze*	Yes	15	177.3	200	0.264	5	3	7	0.558
	No	75	207.1	260		16	14	45	
Metastázy*	Yes	10	158.0	140	0.121	3	4	3	0.135
	No	81	207.8	250		18	14	49	
Recidiva*	Yes	8	183.8	210	0.458	2	2	4	0.899
	No	83	204.1	250		19	16	48	
rs4430796*	Yes	31	207.7	270	0.727	6	2	21	0.951
	No	8	276.3	295		0	1	5	
rs757210*	Yes	36	216.1	275	0.384	0	0	3	0.528
	No	3	290.0	290		6	3	23	

\* – data nebyla dostupná pro všechny případy

<sup>a</sup> – p - hodnoty jsou založené na výsledcích Mann-Whitney U-testu nebo Kruskal-Wallis H-testu

<sup>b</sup> – p - hodnoty jsou založené na výsledcích Pearsonova chí-kvadrát testu (kategorizovaná exprese)



**Obr. 13.** Variabilita exprese HNF1B (H-skóre) ve vztahu ke gradu nádoru. Analýza je založena na 93 případech ccRCC (G1:  $n = 22$ , G2:  $n = 53$ , G3:  $n = 15$ , G4:  $n = 5$ ). Kruskal-Wallisův H-test:  $H(3,93) = 14.50$ ,  $p = 0.002$ . Jeden bod v grafu může představovat více než jeden případ.

#### 4.3.2. Mutační analýza

Mutační analýza byla úspěšně provedena u 53 vzorků nádorové tkáně (39 ccRCC, 2 papRCC, 3chRCC a 90 RO) a 42 vzorků korespondující nenádorové tkáně. V žádném z analyzovaných případů nebyly v kódujících oblastech *HNF1B* a jejich přilehlých úsecích identifikovány varianty třídy 3 – 5.

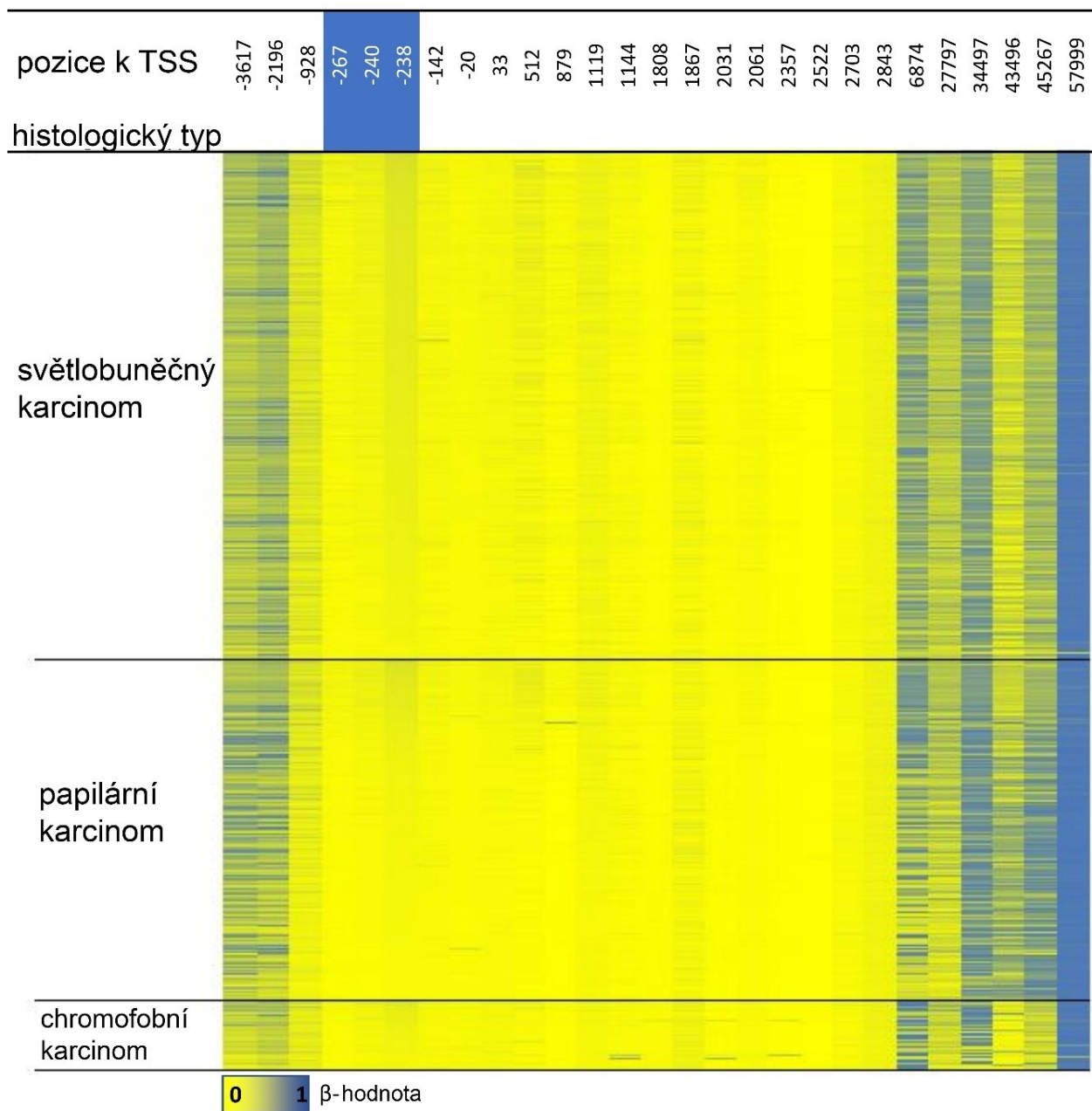
V rámci mutační analýzy jsme se zaměřili také na přítomnost SNP rs4430796 a rs7527210 a jejich asociaci s expresí HNF1B, nicméně biostatistické analýzy neprokázaly mezi těmito parametry žádný vztah.

### 4.3.3. Metylační analýza

Metylační analýza byla úspěšně provedena u celkem 53 vzorků nádorové tkáně (složení viz výše) a 39 vzorků korespondující nenádorové tkáně, které prodělaly bisulfitovou konverzi DNA. V případě nádorů ledvin zahrnovala amplifikovaná oblast promotoru *HNF1B* také specifické CpG ostrůvky (umístěné od TSS genu *HNF1B* na pozici – 238, - 240 a - 267 bp), které jsou dle dat získaných z TCGA nejvíce asociované s expresí HNF1B (hodnocené na úrovni mRNA) v nádorech ledvin.

Metylace promotoru byla identifikována u 2/39 ccRCC (5.1 %) a 1/9 (11.1 %) RO. Ve všech třech případech se jednalo o slabou metylaci (5 – 10 %, H-skóre těchto nádorů bylo 300 a 10 v případě ccRCC, 300 v případě RO). Korespondující párová nenádorová tkáň byla dostupná pouze pro jeden z metylovaných ccRCC a v tomto vzorku nebyla metylace detekována.

Analýzu přítomnosti metylace jsme provedli i na souboru ledvin získaném z TCGA, který zahrnoval 480 případů ccRCC, 321 papRCC a 66 chRCC. Výsledky metylační analýzy byly staženy prostřednictvím Mexpress a jsou uvedeny v Obr. 14 v podobě teplotní mapy. Methylace proximální promotorové oblasti byla zaznamenána u 2/480 ccRCC, 1/321 papRCC a 0/66 chRCC (jako práh pro pozitivní DNA metylaci byla zvolena  $\beta$  hodnota  $> 0.3$ ).



**Obr. 14.** Výsledky metylační analýzy souboru nádorů ledvin získaného z TCGA databáze. Vizualizovaná data výsledků metylační analýzy všech CpG ostrůvků *HNF1B* lokusů byla stažena prostřednictvím Mexpress. Každý řádek představuje jeden vzorek nádorové tkáně, každý sloupec představuje jeden ze 27 analyzovaných CpG ostrůvků. Číselná označení nad sloupečky indikuje pozici daného CpG ostrůvku od TSS genu *HNF1B*. Tři z analyzovaných CpG ostrůvků (zvýrazněné modře) byly zahrnuty také v naší analýze metylace promotoru.

#### 4.4. Nádorové a nenádorové léze prostaty

##### 4.4.1. Imunohistochemické vyšetření a biostatistické analýzy

Pozorované hodnoty exprese HNF1B byly obecně u vzorků karcinomu prostaty (PC) i adenomyomatózní hyperplázie (AH) velmi nízké a jsou uvedené v Tab. 12 a Tab. 13. U karcinomu prostaty se hodnoty H-skóre pohybovaly v rozmezí 0 – 160, přičemž průměrné H-skóre bylo 19.5. Obdobně nízká exprese HNF1B byla zaznamenána i u adenomyomatózní hyperplázie, kde bylo průměrné H-skóre 11.7. Reprezentativní ukázky IHC barvení HNF1B jsou uvedeny v Obr. 15. Mezi expresí u karcinomu prostaty a adenomyomatózní hyperplázie nebyl statisticky významný rozdíl ( $p = 0.925$ ).

**Tabulka 12.** Vztah mezi expresí HNF1B (H-skóre) a typem léze u 119 případů nádorových a nenádorových lézí

Typ léze	<i>n</i>	HNF1B průměr ± SD	HNF1B medián	p – hodnota
PC	101	19.5 ± 36.6	0	0.925
AH	18	11.7 ± 16.9	0	

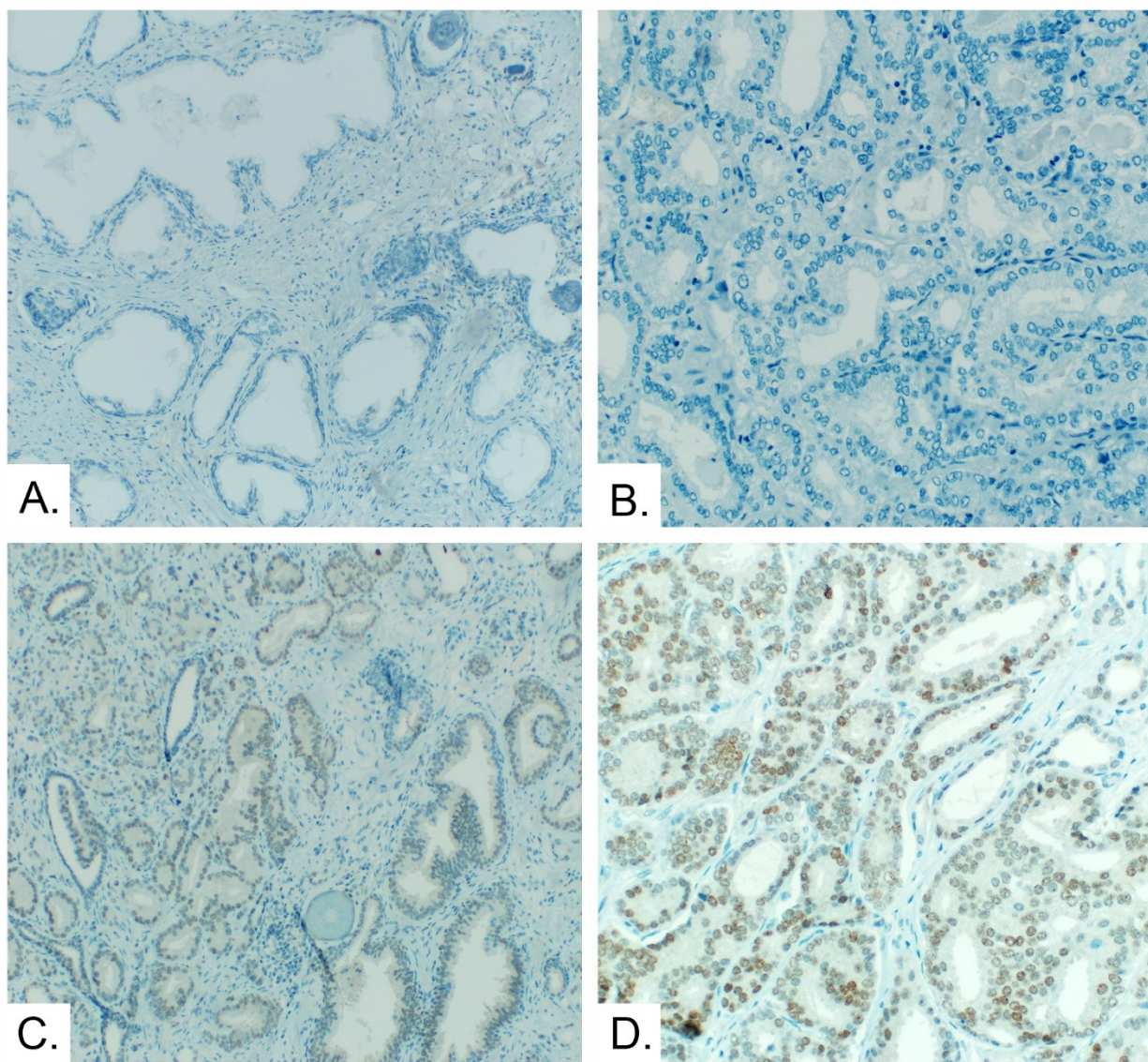
PC – karcinom prostaty, AH – adenomyomatózní hyperplázie

Pro potřeby chí-kvadrát testů a analýz přežití byly hodnoty H-skóre u všech případů kategorizovány do dvou skupin (skupina 1: H-skóre < 10; skupina 2: H-skóre ≥ 10). Provedené analýzy ukázaly, že exprese HNF1B nebyla významně asociovaná se žádným ze sledovaných parametrů (Tab. 13). Hodnocené klinicko-patologické parametry zahrnovaly věk pacienta, stádium onemocnění, Gleasonovo skóre, přítomnost nádoru v resekcích okrajích, lymfovaskulární invazi, přítomnost vzdálených metastáz, naměřené hodnoty PSA před operací, biochemicky hodnocenou recidivu nádoru, metylační stav a přítomnost SNP rs4430796.

**Tabulka 13:** Vztah mezi expresí HNF1B (H-skóre) a klinicko-patologickými charakteristikami u 101 případů karcinomu prostaty.

Charakteristika	Skupina	<i>n</i>	HNF1B průměr ± SD	HNF1B medián	<i>p</i> - hodnota
Věk					0.728
	< 66	53	17.8 ± 35.3	0	
	≥ 66	48	21.4 ± 38.3	0	
Staging					0.871
	T1+2	49	22.2 ± 41.0	0	
	T3+4	52	16.6 ± 32.0	0	
Gleasonovo skóre					0.943
	Low	16	15.0 ± 25.8	0	
	Intermediární	58	20.1 ± 39.3	0	
	High	27	20.9 ± 38.1	0	
Resekční okraje					0.887
	R0	67	18.7 ± 34.2	0	
	R1	34	21.1 ± 42.5	0	
Lymfovaskulární invaze					0.229
	Ano	20	24.0 ± 37.0	2	
	Ne	81	18.4 ± 37.1	0	
Perineurální invaze					0.163
	Ano	86	21.4 ± 38.0	0	
	Ne	15	8.6 ± 28.5	0	
Metastázy*					0.824
	Ano	4	17.5 ± 35.0	0	
	Ne	93	19.1 ± 37.3	0	
Preoperativní hodnoty PSA (ng/ml)*					0.293
	≤ 4	8	23.8 ± 38.9	5	
	4.1-10	54	14.4 ± 34.6	0	
	10.1-20	10	20.0 ± 27.5	5	
	> 20	11	27.3 ± 49.4	0	
Metylace*					0.335
	Ano	28	11.2 ± 26.8	0	
	Ne	24	30.0 ± 51.4	0	
rs4430796*					0.969
	Ano	44	19.4 ± 41.1	0	
	Ne	8	22.5 ± 41.6	0	
Biochemická recidiva*					0.373
	Ano	20	26.1 ± 42.1	0	
	Ne	75	17.1 ± 36.0	0	

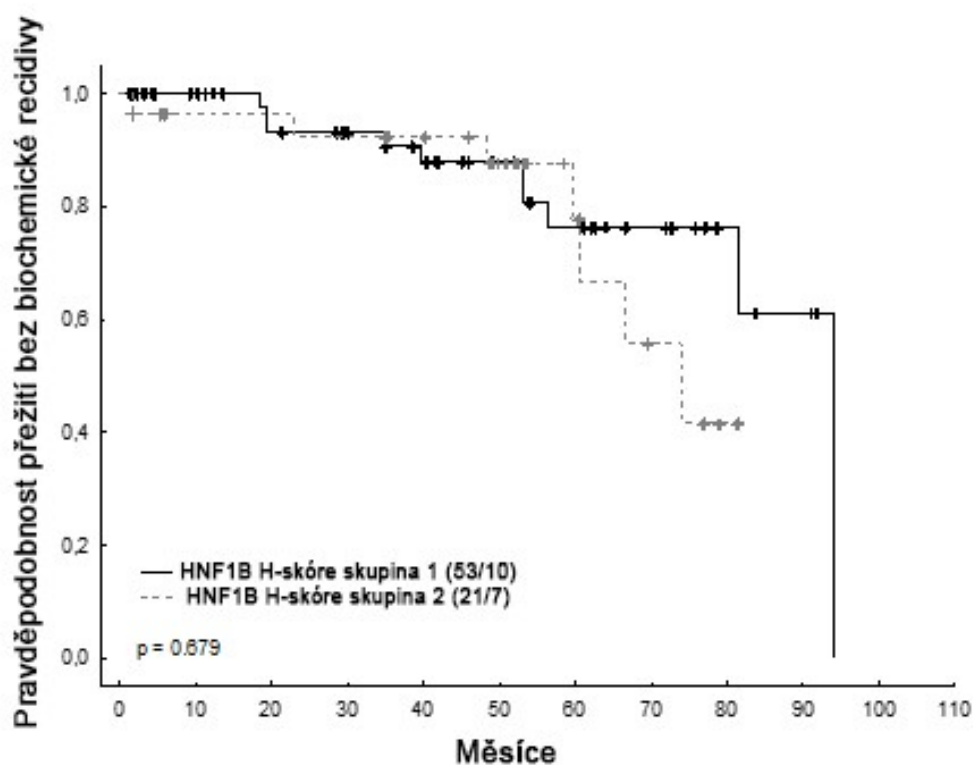
\* – data nebyla dostupná pro všechny případy



**Obr. 15.** Příklady imunohistochemické exprese HNF1B u lézí prostaty. A) Kompletní negativita barvení u adenomyomatózní hyperplázie (100x). B) Kompletní negativita barvení u karcinomu prostaty (200x). C) Difúzní slabá exprese u jiného případu karcinomu prostaty (100x). D) Variabilní slabá až fokálně silná jaderná exprese u případu karcinomu prostaty s GS 8 (200x).

Biochemická recidiva byla definována jako nárůst sérových hladin PSA  $\geq 0.2$  ng/ml po provedení radikální prostatektomie. Jako datum biochemické recidivy bylo použito první datum po operaci, kdy pooperační hodnoty PSA v séru pacienta poprvé dosáhly stanovené koncentrace. S využitím hranice 0.2 ng/ml byla biochemická recidiva zaznamenána u 15/90 (16.6 %)

pacientů s dostupným klinickým follow-up. Medián doby, po které došlo k biochemické recidivě, byl 53 měsíců. Prognostický význam biochemické recidivy byl stanovený pomocí uni- a multivariátních analýz v rámci Kaplan-Meierova modelu a Coxova modelu proporcionálních rizik. Rozdíly v křivkách přežití byly hodnoceny s využitím log-rank testu. V univariátním modelu byla biochemická recidiva statisticky významně spojená s předoperačními hodnotami PSA ( $p = 0.001$ ), pozitivními resekcními okraji ( $p = 0.022$ ), Gleasonovým skóre ( $p = 0.012$ ) a s přítomností lymfovaskulární invaze ( $p = 0.045$ ). V multivariátním modelu si významnost zachovaly předoperační hodnoty PSA ( $p = 0.012$ ) a pozitivita resekcčních okrajů ( $p = 0.022$ ). Pro expresi HNF1B se žádný vztah s biochemickou recidivou nepotvrdil (Obr. 16).



**Obr. 16.** Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti přežití bez biochemické recidivy v závislosti na expresi HNF1B (H-skóre) u 91 případů karcinomu prostaty. H-skóre je kategorizované do 2 skupin: skupina 1 = H-skóre < 10, skupina 2 = H-skóre  $\geq$  10. Počet cenzorovaných/úplných dat je uveden v závorkách.



#### 4.4.2. Mutační analýza

Mutační analýza byla úspěšně provedena u celkem 77 PC a 14 AH. V jednom z analyzovaných PC (1/77, 1.3 %) byla identifikována dosud nepopsaná somatická mutace genu *HNF1B* nejistého významu NM\_000458.2: c.232G > C, p.E78Q, frekvence mutantní alely = 6.4 %. V datech získaných z TCGA byla identifikovaná pouze jedna missense mutace v genu *HNF1B* (NM\_00458.4: c.853G > A, p.G285S), která je v databázi ClinVar popisovaná jako pravděpodobně patogenní.

Kvalitní FT materiál (55 PC, 18 AH) byl také využitý pro analýzu intronového polymorfismu rs4430796 (G/A) pomocí ampliconového sekvenování nové generace. Zaznamenané frekvence homozygotů GG (15.1 % PC; 14.3 % AH), AA (24.5 % PC; 21.4 % AH) a heterozygotů AG (60.4 % PC; 64.3 % AH) byly u obou skupin lézí obdobné, stejně jako celková frekvence alel G/A (A: 53.2 %; G: 46.8 %). Tento náález je v souladu s obecnými populačními daty získanými z databáze 1000Genomes (<https://www.internationalgenome.org>; A: 55.4 %, G: 44.6 %).

#### 4.2.3. Metylační analýza

Analýza metylace promotoru *HNF1B* byla úspěšně provedena u 53 PC a 16 AH. Metylace promotoru byla zaznamenána u 29/53 (55 %) PC a 1/16 (6 %) AH, a byla tak mnohem častější u karcinomu prostaty než u adenomyomatózní hyperplázie ( $p < 0.001$ ). Mezi metylací promotoru a expresí *HNF1B* nebyl potvrzen žádný statisticky významný vztah ( $p = 0.217$ ).

Metylace promotoru *HNF1B* byla významně asociovaná s karcinomy vyššího T stádia (T3 + T4) v porovnání s karcinomy nižšího stádia (T1 + T2). Dále byla exprese také spojená s vyšším Gleasonovým skóre (intermediární a high grade) (Tab. 14).

Data z TCGA obsahovala informace o metylačním stavu 491 karcinomů prostaty, přičemž metylace promotoru byla zaznamenána u 231/491 (47 %) případů. Metylované případy ( $n = 231$ ) vykazovaly výrazně nižší expresi mRNA *HNF1B* než ty nemetylované ( $n = 260$ ,  $p <$

0.001). Exprese HNF1B na mRNA úrovni byla také významně asociovaná s Gleasonovým skóre, kdy byly snížené hladiny exprese spojené s vyšším skóre.

**Tabulka 14.** Vztah mezi metylačním stavem *HNF1B* a klinicko-patologickými charakteristikami u 53 případů karcinomu prostaty. Statisticky signifikantní *p* – hodnoty jsou zvýrazněny **tučně**.

Charakteristika	metylovaný	nemetylovaný	<i>p</i> - hodnota
<b>Věk</b>			0.63
< 66	15	14	
≥ 66	14	10	
<b>Staging</b>			<b>0.002</b>
T1+2	6	15	
T3+4	23	9	
<b>Gleasonovo skóre</b>			<b>0.034</b>
Low grade	1	4	
Medium grade	18	18	
High grade	10	2	
<b>Resekční okraje</b>			0.858
R0	20	16	
R1	9	8	
<b>Lymfovaskulární invaze</b>			0.127
Ano	7	2	
Ne	22	22	
<b>Perineurální invaze</b>			0.532
Ano	25	22	
Ne	4	2	
<b>Preoperativní hodnoty PSA (ng/ml)</b>			0.989
≤ 4	2	2	
4.1-10	20	16	
10.1-20	4	3	
> 20	3	3	
<b>rs4430796</b>			0.631
Ano	24	21	
Ne	5	3	
<b>Biochemická recidiva*</b>			0.917
Ano	5	4	
Ne	22	19	

\* – data nebyla dostupná pro všechny případy

## 5. DISKUZE

---

HNF1B je transkripční faktor, který hraje zásadní roli v embryologickém vývoji řady orgánů, zejména ledvin, pankreatobiliárního a gastrointestinálního traktu (Lau *et al.* 2018; Rezanejad *et al.* 2018). V souvislosti s jeho ontogenetickým významem je v poslední době diskutován i jeho význam z hlediska vzniku, progresu a potenciálně také chemorezistence určitých nádorových onemocnění. Mezi nádory, které jsou nejvíce spojovány s účastí HNF1B, patří zejména karcinomy se světlobuněčným fenotypem (ccRCC, OCCC), vzhledem k tomu, že více než 90 % z těchto nádorů vykazuje silnou IHC HNF1B pozitivitu (Senkel *et al.* 2005; Kobel *et al.* 2009; Buchner *et al.* 2010; Cuff *et al.* 2013; Amano *et al.* 2015; Nemejcova *et al.* 2016).

V této práci jsme provedli komplexní retrospektivní analýzu vlivu a role, kterou HNF1B hraje u vybraných nádorových a nenádorových lézí, zejména s ohledem na expresi HNF1B, jeho genetických a epigenetických změn a možného využití HNF1B jako markeru v diferenciální diagnostice či jako prognostického a prediktivního markeru.

Imunohistochemická analýza HNF1B ve skupině nádorů tlustého střeva potvrdila silnou, difúzní pozitivitu HNF1B v nenádorové sliznici tlustého střeva. Tento náález není překvapivý, vzhledem k tomu, že HNF1B se významným způsobem podílí na embryologické diferenciaci viscerálního endodermu, a tím pádem hraje roli i ve vývoji epitelů tlustého střeva (zejména v rámci jejich terminální diferenciaci) (Suaud *et al.* 1997). Recentní práce autorů Yang *et al.* uvádí, že HNF1B se v normálním epitelu tlustého střeva vyskytuje v hojném množství a v rámci buněčné regulace zde úzce spolupracuje s CDX2, se kterým společně řídí transkripční programy zodpovědné za dynamickou obnovu střevního epitelu (Yang *et al.* 2016). Ontogenetický význam HNF1B pro správný vývoj střeva byl také potvrzen ve studii, která na myším modelu prokázala, že zatímco deficit HNF1A se u myši projevil správným

morfologickým vývojem střeva, ale funkčními defekty, germinální deficit HNF1B vedl k porušené diferenciaci extraembryonálního viscerálního endodermu a byl tak letální (D'Angelo *et al.* 2010).

Silná difúzní pozitivita HNF1B byla na našem souboru pozorována také u adenomů tlustého střeva (s low i high grade dysplastickými změnami). Při porovnání exprese HNF1B u adenomů a karcinomů byla IHC pozitivita HNF1B pozitivně asociovaná s benigní diagnózou, což naznačuje, že v případě lézí tlustého střeva by HNF1B mohl hrát roli tumorsupresoru a mít tak protektivní vliv. Tato nižší exprese HNF1B u kolorektálních karcinomů ve srovnání s adenomy by mohla být následkem porušené diferenciacie intestinálních epitelí, která je dle literárních údajů řízená komplexní sítí navzájem interagujících transkripčních faktorů, mezi které patří zejména HNF1, CDX2 a GATA 4 (Yang *et al.* 2016).

Snížená exprese HNF1B u kolorektálních karcinomů byla statisticky významně asociovaná s rekurencí ( $p = 0.043$ ), nepříznivou prognózou a s kratším DFS ( $p = 0.014$ ). Tento vliv HNF1B v kontextu kolorektálního karcinomu by mohl souviset s některými základními biologickými funkcemi tohoto transkripčního faktoru. HNF1B (a sít' *HNF1B*-asociovaných genů zahrnující více než 30 genů, zejména *FLRT3* a *SLC14A1*) se totiž významně podílí na regulaci procesu chemotaxe a cadherinem zprostředkované adheze ke složkám extracelulární matrix. To vedlo k závěru, že HNF1B by mohl pracovat jako kontrolní spínač, který u normálních nenádorových tkání za správných okolností brání procesu epitel-mezenchymální tranzice (Ross-Adams *et al.* 2016). Snížená exprese HNF1B pozorovaná u lokálně pokročilejších kolorektálních karcinomů a u rekurentního onemocnění by tedy mohla být způsobena invazivnějším fenotypem těchto maligních nádorů, který je spojený s poklesem či ztrátou funkčního vlivu HNF1B.

Co se týče části práce věnované nádorům ledvin, imunohistochemická exprese HNF1B v nenádorovém parenchymu ledvin již byla detailně popsána. V adultním renálním parenchymu je silná exprese HNF1B zachována v epitelích renálních tubulů a také v buňkách vystylajících Bowmannovo pouzdro, zatímco struktury glomerulu a okolní stromální tkáň jsou v IHC průkazu HNF1B negativní (Buchner *et al.* 2010). Výsledky naší IHC analýzy v nádorech ledvin ukázaly, že se exprese HNF1B mezi jednotlivými typy nádorů významně liší.

Nejnižší exprese HNF1B byla pozorována u skupiny chRCC, kde se jednalo buď o výrazně slabou expresi, nebo častěji o zcela chybějící expresi. Náš soubor chRCC je ovšem kvantitativně limitovaný a pro lepší hodnocení toho, do jaké míry je exprese HNF1B u těchto nádorů skutečně downregulovaná, by bylo nutné provést analýzu na větším souboru. Naše výsledky jsou nicméně v souladu s nálezy publikovanými Szponarem *et al.*, kteří u jejich souboru 21 chRCC nepozorovali vůbec žádnou pozitivitu HNF1B (Szponar *et al.* 2011). Obdobné výsledky byly popsány i v jiné studii, kde u skupiny 18 chRCC autoři uvádí významně sníženou expresi HNF1B u 16/18 (89 %) případů (Wang *et al.* 2013).

Chromofobní renální karcinom je na molekulárně genetické úrovni charakterizovaný zejména specifickými aneuploidie, které vedou ke ztrátě celých kopií chromozomů 1, 2, 6, 10, 13 a především chromozomu 17, kde je lokalizovaný také gen *HNF1B* (Lebrun *et al.* 2005). V jedné studii věnované problematice vzniku chRCC byla u většiny případů popsána downregulace exprese HNF1B na úrovni mRNA i proteinu, přičemž snížená exprese HNF1B u pacientů s chRCC silně korelovala s aneuploidii (Sun *et al.* 2017). Stejní autoři také poukazují na roli, kterou v patogenezi chRCC hraje dodatečná ztráta *TP53*, jež by mohla nádorovým buňkám napomáhat v potlačení senescence a programované smrti. Kombinace ztráty *HNF1B* a mutací *TP53* tak zvyšuje úroveň buněčné proliferace a aneuploidie, což u chRCC vede ke vzniku agresivnějšího fenotypu. V kontextu chRCC by tak HNF1B mohl mít tumorsupresorový vliv.

Nejvyšší hodnoty exprese HNF1B jsme zaznamenali u skupiny papilárních renálních karcinomů, které byly těsně následovány skupinou světlobuněčných renálních karcinomů. Oba typy nádorů si tak byly z hlediska exprese HNF1B velmi podobné, navzdory tomu, že pravděpodobný mechanismus patogeneze těchto typů nádorů ledvin je diametrálně odlišný.

Papilární renální karcinomy jsou na molekulárně genetické úrovni charakterizované specifickými trisomiemi a tetrasomiemi týkajícími se zejména chromozomů 7 a 17, kdy jsou s patogenezí papRCC spojované především alterace zde lokalizovaných genů *MET* (7q31) a *HNF1B*. Amplifikace a následná overexprese *MET* je asociovaná s porušenou diferenciací postižených buněk, která je spojená se změnami v počtu kopií segmentů DNA (především jejich nárůstu) či s amplifikací na chromozomu 17. Tyto změny vedou ke konstitutivní overexpresi HNF1B, jež dále podporuje proliferaci buněk s opožděnou či zcela pozastavenou diferenciací, což by mohlo představovat jeden ze základních kroků v postupné progresi vzniku papRCC (Szponar *et al.* 2011; Banyai *et al.* 2018). Naše výsledky ukázaly, že všech 17 případů papRCC vykazovalo určitou úroveň HNF1B exprese, přičemž ve většině případů byla exprese silná. Variabilní úroveň HNF1B pozitivita byla také popsána Szponarem *et al.*, kteří pozorovali silnou IHC pozitivitu HNF1B u 38/67 (57 %) papRCC a také Banyiaem *et al.*, kteří zaznamenali středně silnou pozitivitu HNF1B u 47/76 (62 %) papRCC (Szponar *et al.* 2011; Banyai *et al.* 2018). Vzhledem k literárním údajům, které popisují konzistentní silnou IHC expresi HNF1B u adultních nádorů embryonálního původu (papRCC, ale také mucinózní tubulární vřetenobuněčný karcinom a metanefrický adenom) by tato overexprese HNF1B mohla představovat jeden z hnacích mechanismů vzniku papRCC. HNF1B by tak u papRCC mohl mít roli protoonkogenu.

Na rozdíl od papRCC je v případě ccRCC původ nádoru připisován epitelialním buňkám, jež vystylají proximální tubuly nefronu. V naší skupině ccRCC jsme pozorovali rozdílné úrovně exprese HNF1B u téměř všech analyzovaných případů, což je v souladu

s hypotézou, že v porovnání s nenádorovým renálním parenchymem je exprese HNF1B u tohoto nádoru sice zachovalá, ale variabilně oslabená (Yu *et al.* 2015a). Zachovalá exprese je také popisována Wangem *et al.*, kteří ji v jejich studii pozorovali u 23/24 (96 %) ccRCC (Wang *et al.* 2013). V rozporu s těmito nálezy je práce Szponara *et al.*, kteří u jejich skupiny 98 ccRCC pozorovali jen ojedinělou jadernou pozitivitu HNF1B u několika případech [7/98 (7 %)] (Szponar *et al.* 2011). V naší práci exprese HNF1B u ccRCC významně korelovala s gradem nádoru (nižší hodnoty exprese byly spojené s vyšším gradem).

Asociací mezi sníženou expresí HNF1B a maligním potenciálem ccRCC se zabývali také Buchner *et al.*, kteří zkoumali expresi HNF1B na úrovni mRNA u metastáz ccRCC (Buchner *et al.* 2010). Výsledkem bylo zjištění, že downregulace HNF1B byla významně spojená s progresí nádoru a se špatnou prognózou, což značí, že HNF1B by mohl být užitečným prognostickým faktorem při stratifikaci pacientů s ccRCC. Inaktivace exprese HNF1B dle těchto autorů způsobuje deregulaci sítě transkripčních faktorů, což vede k tumorigenezi a progresi nádorového onemocnění. V tomto kontextu by tedy role HNF1B u ccRCC mohla spočívat ve funkci tumorsupresoru. Tento závěr je nicméně v ostrém kontrastu s popisovanou funkcí HNF1B u jiného nádoru, který je také charakterizovaný světlobuněčným fenotypem – OCCC. V případě OCCC je totiž naopak běžným nálezem overexprese HNF1B, která je spojovaná se vznikem tohoto nádoru (Tsuchiya *et al.* 2003).

Naše výsledky analýzy exprese HNF1B u papRCC a ccRCC dále podtrhují rozdílný původ těchto nádorů, vzhledem k tomu, že se na patogenezi obou onemocnění podílejí odlišné mutace a molekulární signální dráhy. V případě ccRCC je v poslední době diskutován nejen význam HNF1B jako potenciálního prognostického faktoru, ale také jeho možné využití na poli terapie. Zdá se totiž, že HNF1B se na patogenezi ccRCC podílí zejména prostřednictvím své inaktivace, což vede k porušení funkce komplexní sítě transkripčních faktorů. Je tedy možné,

že reaktivace HNF1B a jeho signální funkce by mohla vést k obnovení dysfunkční transkripční sítě (Buchner *et al.* 2010).

Z hlediska možného využití HNF1B v rutinní diagnostické praxi má důležitý význam zejména rozdíl mezi expresí HNF1B u skupiny chRCC a RO. Renální onkocytom je druhý nejčastější benigní tumor ledvin a tvoří 3 – 7 % všech nádorových lézí ledvin (Akin *et al.* 2019). Jednou ze základních morfologických charakteristik tohoto nádoru je jemně granulovaná eosinofilní cytoplazma, která se může nápadně podobat eosinofilnímu podtypu chRCC a rozlišení mezi těmito dvěma nádory tak může být v některých případech obtížné (von Brandenstein *et al.* 2018). Vzhledem k tomu, že biologická povaha těchto dvou nádorů je zásadně odlišná, je správná diagnóza nezbytně nutná pro správný pooperační postup a pro prognózu pacienta. Naše výsledky IHC exprese HNF1B u těchto dvou skupin nádorů po provedení *post-hoc* testů nicméně nedosáhly statistické významnosti ( $p = 0.080$ ). V současné době tedy stále nebyl identifikován jednoznačný a spolehlivý IHC marker vhodný pro odlišení chRCC a RO. Otázkou možného využití HNF1B za účelem rozlišení mezi chRCC a RO se již zabývalo několik publikovaných prací, které jsou ale často provedené na malém počtu případů a jejich výsledky nejsou zcela jednoznačné (Szponar *et al.* 2011; Wang *et al.* 2013; Conner *et al.* 2015).

Další skupinou nádorů, u které jsme analyzovali expresi HNF1B, byl high grade serózní karcinom ovária. V oblasti ženského genitálu se většina publikovaných studií zaměřených na problematiku HNF1B soustředí především na OCCC, ačkoliv exprese HNF1B byla popsána i u dalších typů karcinomů ovária, včetně HGSC (Tomassetti *et al.* 2008; Kalloger *et al.* 2011). HGSC představuje nejčastější karcinom ovária, který má zároveň velmi nepříznivou prognózu. Ačkoliv je HGSC poměrně dobře morfologicky definovanou jednotkou s typickými diagnostickými znaky, část těchto karcinomů v některých případech vykazuje světlobuněčnou



přeměnu buněk a napodobuje tak OCCC. Vzhledem k této podobnosti patří záměna těchto dvou nádorů mezi možná diagnostická pochybení. Tato skutečnost se může odrážet i v poměrně širokém rozmezí udávané incidence OCCC, která sahá od 3 – 12 % všech epitelálních karcinomů ovária v zemích západního světa, přičemž v Japonsku dosahuje udávaná incidence až 20 % (to však může souviset i s jinými faktory) (Sugiyama *et al.* 2000; Itamochi *et al.* 2008; Kobel *et al.* 2010). Správné rozlišení mezi těmito nádory je přitom pro pacientky naprosto zásadní, protože OCCC na rozdíl od HGSC obvykle špatně odpovídá na standardní chemoterapeutický režim založený na platinových derivátech a obecně není indikován pro léčbu PARP inhibitory.

S ohledem na diferenciální diagnostiku tedy již existuje celá řada studií, která se zabývala odlišnou expresí HNF1B u OCCC a HGSC (Kato *et al.* 2006; Yamamoto *et al.* 2007; Kobel *et al.* 2009; Li *et al.* 2014; Huang *et al.* 2016). Jejich výsledky ukázaly, že zatímco pro OCCC je typická silná, difúzní pozitivita HNF1B, u HGSC je exprese HNF1B buď zcela negativní, nebo jen fokální a slabá. Overexprese HNF1B se tak začala využívat v rutinní diagnostické praxi jako vysoce specifický marker OCCC, dosahující až 96.2% senzitivity a 95% specificity (Kao *et al.* 2012).

Analýza IHC exprese HNF1B u našeho souboru 122 HGSC prokázala obecně velmi nízké hladiny exprese, kdy byla pozitivita pozorována pouze u 28 případů (23 %), přičemž zbytek případů byl zcela negativní. Ačkoliv jsou tyto výsledky v souladu s dosud publikovanými daty, která udávají, že exprese HNF1B je u HGSC typicky potlačena, ostatní autoři udávají nižší úroveň zaznamenané positivity. Huang *et al.* našli pozitivitu HNF1B u 1/35 (2.9 %) případů, Kao *et al.* u 3/60 (5 %) případů, Kobel *et al.* u 4.8 % případů a Li *et al.* popisují expresi HNF1B u 4/30 (13.3 %) případů (Kobel *et al.* 2009; Kao *et al.* 2012; Li *et al.* 2014; Huang *et al.* 2016). Vysvětlením pro tuto poměrně nižší udávanou pozitivitu v porovnání s našimi výsledky by mohly být například rozdíly v metodice (použití jiné protilátky s jinou

metodou odkrytí antigenů, jiná metoda vizualizace), či použití jiného postupu pro hodnocení exprese.

U naší skupiny HGSC byly vyšší hodnoty exprese (H-skóre) významně asociovány s lymfovaskulární invazí ( $p = 0.025$ ). Tento výsledek podporuje závěr jiných autorů, kteří uvádí, že HNF1B by se mohl podílet na indukci epitelo-mezenchymální tranzice a získání invazivních vlastností, které jsou klíčové pro agresivní chování nádoru a proces metastazování (Chaffer *et al.* 2016; Matsui *et al.* 2016).

Velmi důležitým aspektem potenciálního významu HNF1B exprese je možnost jeho terapeutického využití. V případě OCCC je HNF1B považován za molekulu, která je klíčová pro vysoce agresivní biologický fenotyp tohoto nádoru. Rolí HNF1B v nádorovém metabolismu se extenzivně zabývali Okamoto *et al.*, kteří uvádí, že HNF1B funguje jako silný supresivní regulátor buněčné proliferace (Okamoto *et al.* 2015). V jejich práci vedlo potlačení exprese HNF1B ke snížení exprese CDKN1A a CDKN1B. To naznačuje, že HNF1B negativně ovlivňuje buněčnou proliferaci tím, že indukuje expresi významných regulátorů buněčného cyklu, jež inhibují progresi G1 fáze. Potlačení exprese HNF1B tak vedlo k výraznému zvýšení podílu buněk v S fázi. Tento poznatek by mohl být reflektovaný i v jedné ze základních charakteristik růstu OCCC a HGSC. Pro HGSC je totiž typická rapidní proliferace nádorových buněk a rychlý růst nádoru, zatímco OCCC obecně roste pomaleji, což by mohlo alespoň částečně souviset s popisovanou overexpresí HNF1B. Supresivní vliv HNF1B na proliferaci nádorových buněk je zároveň doprovázený posunem jejich metabolismu k preferenčnímu využití anaerobní glykolýzy, což je mechanismus, který velmi dobře splňuje metabolické nároky nádorových buněk na rychlou proliferaci (Tsuchiya *et al.* 2003; Amano *et al.* 2015; Okamoto *et al.* 2015). Tyto výsledky naznačují, že overexprese HNF1B u OCCC není zodpovědná za zajištění zvýšené proliferace (jak je patrné u HGSC, jež roste rapidně, ale overexpresi HNF1B vykazuje jen vzácně), ale pravděpodobně k ní dochází za účelem ochrany

nádorových buněk a umožnění jejich přežití. OCCC totiž na rozdíl od jiných karcinomů ovária (s výjimkou endometroidního karcinomu) často vzniká v extrémně metabolicky stresujícím prostředí endometriózy a endometroidních cyst, které je bohaté na volné kyslíkové radikály, jež představují významný stresový faktor (Komiyama *et al.* 2006; Cuff & Longacre 2012; Kondi-Pafiti *et al.* 2012; Ishibashi *et al.* 2017; Ayhan *et al.* 2019; Bas-Esteve *et al.* 2019). Role HNF1B by tak mohla spočívat v potlačení stresových stimulů, které působí na nádorové buňky, čímž jim napomáhá dlouhodobě přežít.

Obdobný závěr je popisovaný v recentní studii autorů Takenaka *et al.*, kteří pracovali se skupinou 68 epiteliálních karcinomů ovária (HGSC a OCCC), u kterých hodnotili expresi HNF1B a její souvislost s prognózou pacientek (Takenaka *et al.* 2019). HNF1B se v této studii uplatnil i při iniciální centrální revizi zahrnutých případů, kdy bylo za pomoci IHC panelu obsahujícího WT1, HNF1B, napsin A, p53 a ER celkem 9 případů HGSC překlasifikováno jako OCCC, neboť tyto nádory vykazovaly expresní profil typický pro OCCC. V rámci této studie autoři identifikovali malou populaci OCCC (14.8 %), která vykazovala ztrátu exprese HNF1B. Chybějící exprese statisticky významně korelovala s lepší odpovědí na platinovou terapii a s delším přežitím bez progresu nemoci (progression-free survival, PFS) a celkovým přežitím (OS, overall survival) (PFS –  $p = 0.0194$ , OS –  $p = 0.0395$ ), a to i u pacientek s reziduální nádorovou masou po stagingovém chirurgickém výkonu. Snížená exprese HNF1B by tak u těchto nádorů mohla souviset s chybějícím protektivním vlivem HNF1B nutným pro ochranu nádorových buněk proti stresorům zevního prostředí. Ztráta HNF1B by tedy mohla pomoci identifikovat podtyp OCCC, které mají o něco lepší prognózu. Zároveň by se mohl HNF1B přímo uplatnit i v terapii, kdy by znovunastolení jeho exprese mohlo obnovit jeho inhibiční funkci na proliferaci buněk. Vynucená exprese HNF1B u buněčné linie serózního karcinomu ovária totiž vedla ve studii Okamoto *et al.* ke zpomalení růstu buněk a potlačené glykolytické aktivitě (Okamoto *et al.* 2015).

Naše práce je také jednou z mála, která se zabývala hodnocením exprese HNF1B na imunohistochemické úrovni u lézí prostaty. V naší práci je u adenomyomatózní hyperplázie i u karcinomu prostaty exprese HNF1B obecně velmi nízká. Při extenzivní revizi literatury byla nalezena pouze jedna studie zaměřená na IHC hodnocení exprese HNF1B u karcinomu prostaty (Debiais-Delpech *et al.* 2014). Její autoři pracovali se skupinou vzorků normální prostatické tkáně ( $n = 91$ ), high grade prostatické intraepiteliální neoplázie ( $n = 61$ ), klinicky lokalizovaného PC (CLC,  $n = 434$ ), metastáz PC ( $n = 28$ ) a PC rezistentního ke kastraci (CRC,  $n = 49$ ), u kterých analyzovali expresi HNF1B v souvislosti s progresí nádoru a agresivitou onemocnění. Pozitivní exprese HNF1B byla výrazně zvýšená u CRC (pozitivita detekovaná u 96 %) a metastáz PC (65 %), v porovnání s nízkou expresí zaznamenanou u CLC (23 %). Autoři také demonstrovali, že exprese HNF1B na úrovni mRNA i IHC vykazovala pozvolný nárůst během progresu PC od prostatické intraepiteliální neoplázie k CLC, CRC, a nakonec k metastatickému onemocnění. U pacientů s CLC tak zde byla pozitivní exprese HNF1B silně asociovaná s proliferací nádorových buněk, progresí nádoru a s karcinomem rezistentním ke kastraci.

Expresí HNF1B hodnocenou imunohistochemicky se také zabývali autoři Dan *et al.*, kteří ji hodnotili u myšího modelu acinárního adenokarcinomu prostaty (Dan *et al.* 2019). Myši s karcinomem prostaty v pokročilém stádiu vykazovaly v jejich studii utlumenou expresi HNF1B. Jejich výsledky tak potvrzují, že během vzniku a progresu PC dochází ke ztrátě původní tumorsupresorové funkce HNF1B, která je zapříčiněná downregulací jeho exprese. Obdobný závěr je popisovaný i v další práci, která se zabývala vlivem HNF1B na proliferaci nádorových buněk (Lu *et al.* 2020). Autoři této recentní studie udávají, že HNF1B inhibuje rychlost proliferace buněk karcinomu prostaty, neboť overexprese HNF1B v buňkách karcinomu prostaty vedla k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi a k snížené expresi cyklinu D. Jejich práce tak předkládá nové důkazy o tom, že HNF1B se u karcinomu prostaty

pravděpodobně uplatňuje jako tumorsupresorový gen. Tato hypotéza je také potvrzena našimi výsledky, které ukázaly, že exprese HNF1B je u PC výrazně snižena.

Potlačenou expresi HNF1B u buněčných linií karcinomu prostaty udávají také Wang et al. (Wang *et al.* 2020). Autoři tento nálezný dávají do souvislosti s tím, že HNF1B byl recentně označen za přímý downstream cíl faktoru EZH2. Obnovená vynucená exprese HNF1B u nádorových buněk PC v jejich práci potlačovala rychlý růst nádoru a procesy spojované s epitel-mezenchymální tranzicí (jako je buněčná migrace a invaze), které jsou funkčně zprostředkovávány právě vlivem EZH2. Jejich výsledky také ukázaly, že vysoká úroveň exprese HNF1B silně predikuje lepší prognózu PC.

Kromě charakteristiky exprese HNF1B na IHC úrovni a jejího významu jsme se zabývali také identifikací možných genetických alterací genu *HNF1B*. Problematika somatických či germinálních mutací *HNF1B* u maligních nádorů je v literatuře (na rozdíl od mutací spojovaných s vrozenými malformacemi urogenitálního a pankreatobiliárního systému) popisována extrémně vzácně. Objevuje se několik publikací (převážně kazuistik), které se zabývají germinálními mutacemi *HNF1B* asociovanými se vznikem chromofobního renálního karcinomu, které obecně poukazují na to, že v případě chRCC má *HNF1B* pravděpodobně tumorsupresorový vliv (Lebrun *et al.* 2005; Rebouissou *et al.* 2005). Co se týče somatických mutací, informace v literatuře jsou obdobně vzácné. Na základě extenzivní revize literatury byla identifikována pouze jedna z našich recentních prací, která popisuje somatické mutace genu *HNF1B* v nádorech ženského pohlavního systému (Nemejcova *et al.* 2015). V této práci byla provedena analýza celých kódujících sekvencí *HNF1B*, jež odhalila přítomnost jedné klinicky relevantní somatické mutace u 1/30 endometroidních karcinomů endometria a jedné missense varianty neznámého klinického významu u 1/12 OCCC.

Zatímco v naší skupině adenomů tlustého střeva nebyly identifikovány žádné mutace, ve skupině kolorektálních karcinomů byly nalezeny 3/73 (4.1 %) inaktivační somatické mutace. Dvě z těchto variant byly frameshift mutace se zachovalou imunohistochemickou expresí HNF1B, zatímco v třetím případě se jednalo o nonsense mutaci se zachovalou, ale výrazně sníženou expresí HNF1B. Zachovalou IHC expresí u prvních dvou případů je možné vysvětlit inkompletní inaktivací jedné či obou alel *HNF1B*, ale také možnou nádorovou heterogenitou.

Přítomnost a vliv mutací *HNF1B* na malignity kolorektální oblasti nebyla dosud zkoumána. V současné době tedy stále není zcela jasné, jaký vliv by mohly mutace genu *HNF1B* mít na kolorektální karcinogenezi, ačkoliv jsou práce, které naznačují, že *HNF1A* by se mohl podílet na vzniku MSI-high kolorektálního karcinomu (Laurent-Puig *et al.* 2003). Autoři této studie uvádějí, že u jejich skupiny 64 MSI-high kolorektálních karcinomů byly mutace *HNF1A* detekovány u 15 případů (15/64), zatímco u MSS kolorektálních karcinomů a adenomů žádné z těchto mutací identifikovány nebyly.

V naší skupině nádorů ledvin mutační analýza neodhalila přítomnost žádných somatických či germinálních variant třídy 3-5. Tento výsledek je v souladu s literárními daty, která ukazují, že zatímco již bylo objeveno a popsáno více než sto unikátních germinálních mutací *HNF1B* projevujících se některou formou vzácných vývojových vad ledvin (Madariaga *et al.* 2019), o somatických mutacích *HNF1B* a jejich významu v karcinogenezi je prozatím známo velmi málo. Výjimku představují nečetné kazuistiky a studie uvedené výše (Lebrun *et al.* 2005; Rebouissou *et al.* 2005), které zmiňují, že vývojové malformace ledvin spojené s mutacemi v *HNF1B* jsou také asociované s predispozicí pro vznik chRCC (Wang *et al.* 2013).

V části věnované HGSC ovária jsme u jednoho z analyzovaných případů identifikovali dosud nepopsanou somatickou nonsense mutaci. Z našich výsledků tedy vyplývá, že exprese HNF1B v HGSC je pravděpodobně regulovaná buď prostřednictvím hypermetylace promotoru, nebo vlivem jiných regulačních mechanismů ovlivňujících aktivaci transkripce, spíše než

prostřednictvím mutací v kódujících sekvencích *HNF1B* či posttranslačních modifikací genové exprese.

Mutace genu *HNF1B* byly velmi sporadickým nálezem také u skupiny karcinomů prostaty, kde jsme zaznamenali pouze jednu somatickou aberaci, která byla klasifikována jako varianta nejistého významu. Obdobný výsledek jsme pozorovali i u skupiny 491 PC získané z TCGA, kde byla identifikována jedna somatická mutace (klasifikována jako pravděpodobně patogenní). U karcinomu prostaty tedy pravděpodobně není inaktivace funkce *HNF1B* zprostředkována genovými mutacemi.

Mnohem více prostoru než v případě mutací je v literatuře věnováno změnám v nekódujících intronových sekvencích *HNF1B*. Specifické jednonukleotidové polymorfismy *HNF1B* již byly asociovány se zvýšeným rizikem vzniku několika různých nádorů, zejména karcinomů endometria, prostaty a ovária (Sun *et al.* 2008; Shen *et al.* 2013; Painter *et al.* 2015; Ross-Adams *et al.* 2016), ale i karcinomu plic, kde je vliv *HNF1B* spojený s dysregulací Wnt signální kaskády (Sun *et al.* 2011). Další studie jsou zaměřené na vliv SNP *HNF1B* na prognózu vybraných nádorů. Například v případě mnohočetného myelomu bylo popsáno, že varianta rs7501939 genu *HNF1B* je významně spojená s horším celkovým přežitím (Rios-Tamayo *et al.* 2016).

Na základě celogenomových asociačních studií (genome-wide association studies, GWAS) bylo identifikováno několik konkrétních SNP *HNF1B*, pro které se popisuje asociace s rizikem vzniku různých karcinomů. Jedná se zejména o rs447096, rs7527210 a několik dalších SNP, studovaných zejména v souvislosti s karcinomem prostaty (rs1016990, rs7501939, rs11649743, rs7405696, rs4794758 a rs3094509) (Harries *et al.* 2010; Berndt *et al.* 2011; Kim *et al.* 2011). Navzdory narůstajícímu počtu publikací, věnovaných problematice SNP *HNF1B*, je ovšem jejich význam a souvislost se vznikem maligních nádorů stále nejasný. Vzhledem

k tomu jsme se v naší práci věnovali analýze dvou vybraných, nejčastěji popisovaných SNP (rs4430796 a rs7527210) s ohledem na stanovení vztahu mezi těmito specifickými intronovými sekvencemi a prognózou studovaných maligních nádorů.

U skupiny kolorektálních karcinomů v našem souboru nebyl v případě SNP rs7527210 zaznamenán žádný významný vztah s monitorovanými parametry přežití ( $p = 0.942$ ). V literatuře je rs7527210 diskutován zejména v souvislosti s karcinomem ovária a prostaty (Ross-Adams *et al.* 2016), pro kolorektální karcinom zde nejsou dostupná srovnatelná data. V případě rs447096 jsme pozorovali statisticky významné rozdíly v odhadovaném DFS v závislosti na třech různých genotypech rs447096, přičemž genotyp GG byl asociovaný s nejhorší prognózou. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky studií provedených na jiných typech nádorů, kdy zejména v případě karcinomu endometria je GG genotyp spojovaný s nejhorším OS (Mandato *et al.* 2015). Tento nález by mohl souviset s popisovaným vlivem overexprese HNF1B na chemorezistenci světlobuněčného karcinomu ovária, neboť G alela je v literatuře spojována se sníženou chemosensitivitou k cisplatinové či paklitaxelové toxicitě (Shigetomi *et al.* 2014). Vzhledem k tomu, že v případě kolorektálního karcinomu tvoří základní chemoterapeutický adjuvantní režim především fluoropyrimidinové a oxaliplatinové preparáty, je tento nález zvláště důležitý (Kountourakis *et al.* 2016).

V části práce zaměřené na nádory ledvin také nebyl zaznamenán žádný významný vztah mezi SNP rs4430796 a rs7527210 a expresí HNF1B. Na základě těchto výsledků lze tedy očekávat, že u studovaných případů jsou klíčové události v alteraci *HNF1B* pravděpodobně zprostředkovány jinými mechanismy, nebo prostřednictvím vzácnějších SNP, které nebyly v našich analýzách zahrnuty.

U skupiny HGSC ovária také nebyl žádný z analyzovaných SNP (rs4430796, rs7527210, rs7405776) signifikantně asociovaný s IHC expresí HNF1B, ani s metylací promotoru *HNF1B*. Identifikací výskytu a vlivu SNP na HGSC a OCCC se zabývali také Shen *et al.*, kteří u HGSC



identifikovali jako rizikovou alelu rs7405776, která ale nevykazovala statisticky významnou asociaci se zvýšenou metylací *HNF1B* promotoru (potvrzen byl pouze hraniční vztah,  $p = 0.07$ ) (Shen *et al.* 2013). Naše výsledky jsou tak v souladu s výše uvedenými daty.

K odlišnému závěru ale došli Ross-Adams *et al.*, jejichž experimentální závěry ukazují, že u HGSC byla jimi zkoumaná riziková alela rs757210 G asociovaná s epigenetickou inaktivací *HNF1B* (Ross-Adams *et al.* 2016). Jedinci nesoucí tuto vysoce rizikovou alelu jsou tak predisponováni k procesu EMT, který by mohl být dále podpořen dalšími stresory typickými pro nádorové buňky (jako je např. aberantní metabolismus). Autoři dále udávají, že dle výsledků jejich funkčních esejí se *HNF1B* chová jako pro-diferenční faktor, který v nenádorových nemetylovaných tkáních potlačuje epitel-mezenchymální tranzici a během progresu do HGSC je tato jeho tumorsupresorová funkce ztracena. Jednonukleotidové polymorfismy v genu *HNF1B* jsou tak dle nich asociovány s HGSC a OCCC podtypy karcinomů ováří zcela opačným způsobem jak na úrovni genetické a epigenetické, tak i na úrovni exprese. Tento závěr je v souladu s odhadovanou tumorsupresorovou rolí *HNF1B* u HGSC, a naopak onkogenní rolí u OCCC.

Význam SNP je zvláště zdůrazňovaný zejména u karcinomu prostaty, neboť PC patří mezi nejvíce dědičností ovlivněné malignity. Problematika SNP a rizika vzniku karcinomu prostaty je v odborné literatuře popisována v řadě studií, přičemž do současnosti bylo identifikováno více než rizikových 40 lokusů spojených s karcinomem prostaty (Grisanzio *et al.* 2012). Navzdory velkému množství prací, které se této otázce věnují, ovšem stále není role a klinický význam vybraných SNP zcela jasná a stejné SNP jsou v různých studiích někdy označovány buď za rizikové, či naopak za varianty protektivní, což dále podtrhuje komplexnost tohoto tématu.

Nejčastěji je v souvislosti s karcinomem prostaty zmiňovaný SNP rs4430796, na kterém můžeme dobře demonstrovat významné rozdíly mezi dříve publikovanými výsledky. Většina

provedených GWAS označuje variantu rs4430796 za významný faktor, který je ale dle některých autorů označován jako protektivní, spojený se sníženým rizikem vzniku PC (Thomas *et al.* 2008; Elliott *et al.* 2010; Stevens *et al.* 2010; Berndt *et al.* 2011; Kim *et al.* 2011; Chornokur *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2015), zatímco dle jiných autorů se jedná o variantu asociovanou se zvýšeným rizikem vzniku PC (Gudmundsson *et al.* 2007; Sun *et al.* 2008; Grisanzio *et al.* 2012; Hu *et al.* 2013). Podobně nejednotné výsledky jsou ale udávány i pro variantu rs7405696, která se dle různých prací uplatňuje buď jako rizikový faktor (Berndt *et al.* 2011), nebo jako faktor protektivní (Kim *et al.* 2011). Stejně tak varianta rs7501939 byla asociovaná se zvýšeným (Gudmundsson *et al.* 2007; Kim *et al.* 2011; Chornokur *et al.* 2013) i sníženým rizikem vzniku PC (Stevens *et al.* 2010). Další varianty, pro které se uvádí asociace se zvýšeným rizikem PC, představují rs11649743 G a rs3760511 G, které byly v jedné studii spojovány se sníženou metylací promotoru *HNF1B*, a tudíž se zvýšenou expresí *HNF1B* u dvou nezávislých klinických kohort (Ross-Adams *et al.* 2016).

Na základě množství prací zabývajících se vlivem SNP na karcinom prostaty byla recentně publikovaná robustní metaanalýza, která také hodnotila asociaci mezi nejčastěji popisovanými variantami *HNF1B* a rizikem vzniku PC (Tong *et al.* 2018). Její autoři pracovali se souborem čítajícím téměř 35 tisíc pacientů a 56 tisíc kontrol a našli silnou pozitivní asociaci s genotypem rs4430796 A, AA a AG, a dále také s genotypy rs7501939 G, rs11649743 G, GG, a AG, a s genotypem rs3760511 C. V naší práci jsme se zabývali variantou rs4430796 (G > A), přičemž celková frekvence detekovaných alel byla prakticky stejná, jakou udávají data uvedená pro obecnou populaci v databázi 1000G. U naší početně limitované skupiny se tak asociace polymorfismu rs4430796 s karcinomem prostaty nepotvrdila.

Epigenetické změny jsou jedním ze základních regulačních mechanismů genové exprese, které se často účastní na vývoji maligních nádorů (Cuff *et al.* 2013). Jednou

z nejčastějších epigenetických alterací je DNA metylace, což je reverzibilní proces který představuje jeden z potenciálních terapeutických cílů využitelných při cílené protinádorové terapii (Bubancova *et al.* 2017). Aberantní metylace promotorových oblastí určitých tumorsupresorových genů vede k útlumu exprese (tzv. silencing) těchto tumorsupresorů, což představuje jednu z klíčových událostí iniciace nádorového růstu. Epigenetické alterace jsou v procesu kancerogeneze relativně časnou událostí, a proto by se mohly úspěšně uplatnit nejen jako neinvazivní biomarker přítomnosti nádorového onemocnění během screeningu, ale také jako biomarker v monitorování odpovědi na terapii (Graham *et al.* 2009).

U naší skupiny nádorů tlustého střeva byla zaznamenána pouze slabá parciální metylace u několika případů, které všechny vykazovaly zachovalou proteinovou expresi HNF1B. Methylace promotoru tak v tomto souboru nekorelovala s expresí HNF1B na proteinové úrovni, což by mohlo být následkem inkompletní inaktivace genu *HNF1B*. Methylace promotoru *HNF1B* tedy nebyla v našem souboru častým nálezem, což je v ostrém kontrastu s výsledky jedné z několika málo prací, které se touto problematikou zabývaly. Dle těchto autorů je *HNF1B* společně s *RUNX3*, *PCDH10*, *SFRP5* a *IGF2* jedním z pětice genů, které v jejich studii vykazovaly nejvyšší průměrná procenta hypermethylace promotoru (Silva *et al.* 2013). Na základě tohoto nálezu autoři dokonce navrhují, že by hypermethylace promotoru *HNF1B* mohla sloužit jako jeden z neinvazivních epigenetických markerů kolorektálního karcinomu. Epigenetická inaktivace *HNF1B* u buněčných linií kolorektálního karcinomu byla popsána také v práci autorů Terasawa *et al.*, což dle autorů poukazuje na jeho účast na kolorektální karcinogenezi (Terasawa *et al.* 2006).

Jedno z možných vysvětlení pro takto odlišné výsledky by mohlo v případě autorů Silva *et al.* spočívat v odlišném metodickém přístupu (autoři pracovali s Methyl-Profiler™ DNA Methylation PCR Array systémem). Důležitý je také fakt, že v jejich práci pracovali se souborem pouze 10 nádorů (Silva *et al.* 2013). V případě studie autorů Terasawa *et al.* byla

metylace *HNF1B* analyzovaná pouze v exonu 1, což by mohlo objasnit odlišné výsledky, protože v naší práci byla metylace testována v oblastech, které se nachází upstream od exonu 1 (Terasawa *et al.* 2006).

Ve skupině nádorů ledvin byla metylace promotoru *HNF1B* nalezena pouze vzácně, což je v souladu s daty získanými z TCGA. Oba výsledky tak naznačují, že se na regulaci exprese *HNF1B* v tomto případě pravděpodobně podílí jiné mechanismy než promotorová metylace. Nicméně je důležité zmínit, že v naší práci jsme se zabývali pouze oblastí CpG ostrůvku, který je dle literárních dat a TCGA nejvíce spojován s *HNF1B* expresí (Shen *et al.* 2013) a před tím, než bude role metylace v tomto kontextu zcela vyloučena, by bylo nutné provést extenzivnější analýzu.

U skupiny HGSC byla metylace promotoru *HNF1B* detekována u 38.8 % případů, nicméně metylační status nebyl významně asociovaný se žádným ze sledovaných klinicko-patologických parametrů. Obdobné výsledky metylační analýzy byly publikovány i dalšími autory, kteří udávají metylaci v rozmezí 41.3 % (Terasawa *et al.* 2006) až 50.8 % (Baranova *et al.* 2020). Bubancová *et al.* se zabývali metylací promotoru *HNF1B* u různých typů karcinomů ovária a identifikovali metylaci u 18/40 (45 %) HGSC (Bubancova *et al.* 2017). Epigenetický „silencing“ *HNF1B* u HGSC je popisovaný i v práci autorů Shen *et al.*, jejichž metylační data ukazují, že kauzální rizikové alely pro HGSC (rs7405776) by mohly predisponovat promotor *HNF1B* k aberantní metylaci, a tím i podporovat vznik serózních, ale ne světlobuněčných tumorů (Shen *et al.* 2013).

Možným praktickým využitím metylace se u HGSC zabývali autoři recentní studie, zaměřené na identifikaci potenciálního metylačního panelu biomarkerů za účelem časně detekce HGSC (Baranova *et al.* 2020). Autoři zkoumali panel čtyř vybraných genů (*HNF1B*, *CDH13*, *PCDH17* a *GATA4*), který dosáhl jako screeningový marker 100% specificity a 88.5% senzitivity. Methylace promotoru byla detekovaná u 31/61 (50.8 %) HGSC, přičemž častější byla

u nádorů pokročilého stádia [27/47 (57.5 %)] než u nádorů časného stádia [4/14 (28.6 %)]. U našeho souboru HGSC jsme pozorovali obdobný trend (stádium I/II 30 % vs. stádium III/IV 41.7 %), který ale nedosáhl statistického významu ( $p > 0.05$ ). Přítomnost metylace promotoru *HNF1B* už u nádorů v časném stádiu nicméně naznačuje, že by metylace mohla představovat slibný marker pro časnou detekci HGSC. Vzhledem k tomu, že HGSC představuje nádor s velmi nenápadnými a nespecifickými klinickými symptomy a onemocnění je tak často diagnostikováno až v pokročilém stádiu, je identifikace biomarkerů pro časnou diagnostiku velmi žádoucí.

Rolí epigenetické inaktivace u regulace exprese *HNF1B* jsme se zabývali i u naší skupiny karcinomů prostaty. Methylace promotoru *HNF1B* byla identifikována u 55 % PC, což je obdobný výsledek, jaký uvádí data získaná z TCGA (47 %). Methylaci promotoru *HNF1B* se zabývali i autoři Ross-Adams et al., kteří u dvou samostatných kohort pacientů s karcinomem prostaty ( $n = 65$ ,  $n = 36$ ) pozorovali, že tkáně PC byly ve srovnání se zdravými, nenádorovými tkáněmi hypermetylované (Ross-Adams et al. 2016). Jejich experimentální data tak ukazují, že u karcinomu prostaty a HGSC ovária by se na vzniku nádoru mohly podílet obdobné mechanismy. Za účelem identifikace biologických drah, kterých se *HNF1B* účastní u nádorových buněk, autoři generovali stabilní buněčné linie karcinomu prostaty overexprimující *HNF1B*. U několika buněčných linií overexprese *HNF1B* korespondovala u buněk PC s výrazným poklesem proliferace, snížené rychlosti buněčné migrace, výrazným poklesem invazivity a s několika dalšími alteracemi, které naznačují, že ztráta exprese *HNF1B* hraje zásadní roli v procesu EMT. Tento závěr byl podpořen skutečností, že u nádorových buněk overexprimujících *HNF1B* došlo ke změně tvaru z původního protáhlého vřetenitého na tvar epiteloidní.

## 6. ZÁVĚR

---

HNF1B je tkáňově specifický transkripční faktor, jehož význam pro vznik vývojových malformací ledvin a dalších orgánů již byl poměrně dobře a extenzivně popsán, zatímco jeho uplatnění v patogenezi solidních nádorů dosud nebylo objasněno. Hlavním cílem této práce je prohloubení znalostí o významu změn HNF1B u vybraných solidních nádorů. Zahrnuté typy nádorů byly selektovány na základě provedené rešerše literatury, s ohledem na dosavadní popisovaný význam HNF1B u karcinogeneze nádorových onemocnění a jeho využití v rutinní diagnostické praxi.

Naše data ukazují, že v rámci diferenciální diagnostiky je na IHC úrovni hlavní význam hodnocení exprese HNF1B u nádorů ledvin, zejména v oblasti odlišení chRCC od renálního onkocytomu. Další využití je u nádorů ženského genitálu, nicméně poměrně vysoké procento exprese u HGSC v našem souboru (v souladu s recentními literárními daty) význam HNF1B v této indikaci limituje. Z našich výsledků zároveň ale vyplývá, že se jeho význam zvyšuje, pokud zohledníme intenzitu exprese (neboť silná exprese byla nalezena převážně jen u OCCC). Potenciální impakt těchto výsledků v klinické praxi by tak mohl spočívat nejen v lepší stratifikaci nádorových podtypů a potenciálních nových terapeutických přístupů, ale také v lepším porozumění etiologie těchto onemocnění. Z hlediska prognostického významu měla IHC exprese HNF1B význam zejména u kolorektálního karcinomu, kde snížená exprese korelovala s recidivou a byla spojená s horší prognózou a kratším DFS.

S ohledem na význam HNF1B v patogenezi nádorů naše výsledky ukázaly, že u kolorektálního karcinomu, high grade serózního karcinomu ovária, karcinomu prostaty, světlobuněčného a chromofóbního karcinomu ledviny by se HNF1B mohl chovat jako tumorsupresor, zatímco u papilárního karcinomu ledviny spíše jako protoonkogen. Vzhledem k odlišné hypotetické roli, kterou HNF1B hraje u různých typů nádorů ledvin, by tak HNF1B

mohl představovat důležitý prognostický faktor umožňující lepší stratifikaci pacientů s ohledem na narůstající využití cílené terapie u nádorových onemocnění. Analýzy SNP potvrdily u kolorektálního karcinomu asociaci GG fenotypu rs447096 s horší prognózou onemocnění, zatímco u ostatních typů nádorů se asociace studovaných polymorfismů s prognózou či rizikem vzniku nádoru nepotvrdila. Klíčové události v alteraci HNF1B jsou tak pravděpodobně zprostředkovány jinými mechanismy (nebo prostřednictvím vzácnějších SNP, které nebyly v našich analýzách zahrnuty). Část práce věnovaná epigenetickým alteracím má význam zejména u HGSC, kde byla potvrzená poměrně vysoká úroveň metylace, což v souladu s literaturou naznačuje, že by metylace mohla představovat slibný marker pro časnou detekci HGSC.

Závěrem je ovšem důležité zdůraznit, že za účelem přesného stanovení toho, jakou roli hraje HNF1B v biologii vybraných nádorů a objasnění jeho potenciálního prognostického a terapeutického využití je zapotřebí provést další studie na větším množství případů.

## 7. ABSTRAKT

---

HNF1B je tkáňově specifický transkripční faktor, který hraje zásadní roli v embryonálním vývoji celé řady orgánů, zejména ledvin, gastrointestinálního systému, pankreatu a žlučových cest. Zatímco význam HNF1B pro vznik vývojových malformací ledvin a dalších orgánů již byl poměrně dobře popsán, jeho uplatnění v patogenezi solidních nádorů dosud nebylo objasněno. Dle dostupných dat se ukazuje, že HNF1B se v závislosti na různých typech nádorů pravděpodobně může na procesu karcinogeneze podílet buď jako onkogen, nebo jako tumorsupresor. Přesný mechanismus, jakým tuto svoji roli uplatňuje, ovšem není jasný.

Práce je zaměřená na prohloubení znalostí o významu změn HNF1B u vybraných solidních nádorů i nenádorových lézí. Jednotlivé cíle zahrnují: 1) objasnění role, kterou HNF1B hraje v patogenezi těchto lézí, 2) zhodnocení možného významu HNF1B pro diferenciální diagnostiku jednotlivých lézí, 3) analýzu možného prognostického a prediktivního významu HNF1B, 4) mutační analýzu genu *HNF1B* u všech nádorových i nenádorových tkání s cílem identifikovat dosud nepopsané somatické patogenní mutace, 5) metylační analýzu promotoru genu *HNF1B*.

Imunohistochemické vyšetření s protilátkou proti HNF1B bylo provedeno u celkem 516 vzorků nádorové a nenádorové tkáně. Mutační analýzy zahrnovaly amplikonové sekvenování nové generace či panelové sekvenování a byly úspěšně provedeny u 400 vzorků. Analýza metylačního stavu promotoru genu HNF1B byla provedena u 321 vzorků. Naše data byla také porovnána s daty dostupnými z The Cancer Genome Atlas.

Hlavní získané výsledky: 1) U adenomů tlustého střeva je exprese HNF1B signifikantně vyšší než u karcinomů. 2) Nízká exprese HNF1B u karcinomů tlustého střeva korelovala s rekurencí a se zkráceným DFS. 3) Mezi všemi 4 analyzovanými typy nádorů ledvin byly výrazné rozdíly v rozsahu exprese HNF1B a její intenzity. 4) U světlobuněčného karcinomu ledviny (ccRCC) byla nejvyšší exprese u nádorů s grade 1 a klesala s rostoucím gradem. 5) U



high grade serózního karcinomu ovária (HGSC) je exprese HNF1B obecně nízká a vyšší exprese byla asociovaná s lymfovaskulární invazí. 6) Metylace promotoru byla u karcinomu prostaty spojená s karcinomy vyššího T stádia a s vyšším dosaženým Gleasonovým skóre. 7) Celkem jsme našli 5 variant genu HNF1B: 3 u kolorektálního karcinomu, 1 u HGSC, 1 u karcinomu prostaty.

V rámci diferenciální diagnostiky je na IHC úrovni hlavní význam hodnocení exprese HNF1B u nádorů ledvin, zejména v oblasti odlišení chRCC od renálního onkocytomu. Další využití je u nádorů ženského genitálu, nicméně poměrně vysoké procento exprese u HGSC v našem souboru význam HNF1B v této indikaci limituje. Z prognostického hlediska měla IHC exprese HNF1B význam zejména u kolorektálního karcinomu, kde snížená exprese korelovala s recidivou a byla spojená s horší prognózou. S ohledem na význam HNF1B v patogenezi nádorů naše výsledky ukázaly, že u kolorektálního karcinomu, HGSC ovária, karcinomu prostaty, ccRCC a chRCC ledviny by se HNF1B mohl chovat jako tumorsupresor, zatímco u papilárního karcinomu ledviny spíše jako protoonkogen. Část práce věnovaná epigenetickým alteracím má význam zejména u HGSC, kde byla potvrzená poměrně vysoká úroveň metylace, což v souladu s literaturou naznačuje, že by metylace mohla představovat slibný marker pro časnou detekci HGSC.

## 8. SUMMARY

---

HNF1B is a tissue-specific transcription factor, which plays a crucial role in the embryological development of a number of organs, especially kidneys, gastrointestinal system, pancreas and biliary system. While the significance of HNF1B in the development of urinary tract malformations has already been well described, its role in the pathogenesis of solid tumors has not yet been elucidated. Based on the current data it seems that depending on the type of individual tumor HNF1B can either act as an oncogene or a tumor suppressor. However, the precise mechanism of how it exerts its influence is still unclear.

The thesis focuses on expanding the knowledge of the significance of HNF1B changes in selected solid tumors and non-neoplastic lesions. The individual goals include: 1) determining the role which HNF1B plays in the pathogenesis of these lesions, 2) evaluating the significance of HNF1B for differential diagnosis, 3) analysis of the prognostic and predictive meaning of HNF1B, 4) mutation analysis of the HNF1B gene in all the tumor and non-tumor tissues with the aim to identify novel pathogenic mutations, 5) methylation analysis of the HNF1B promoter.

Immunohistochemical examination with the antibody against HNF1B was performed on 516 samples of tumor and non-tumor tissues. The mutation analyses included new generation amplicon sequencing or capture-based sequencing and were successfully performed on 400 samples. The mutation analysis was performed on 321 samples. Our data was also compared to the data available from The Cancer Genome Atlas.

The main experimental results include the following: 1) The expression of HNF1B is significantly higher in colon adenomas than in carcinomas. 2) Low expression of HNF1B in colorectal carcinomas correlated with recurrence and shorter DFS. 3) There were significant differences in HNF1B expression across all 4 groups of renal tumors. 4) The highest expression of HNF1B in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) was observed in grade 1 tumors and was

decreased with increasing grade. 5) In high grade serous carcinoma (HGSC) of the ovary the expression of HNF1B is generally low and higher expression was associated with lymphovascular invasion. 6) In prostate carcinoma, promoter methylation was associated with tumors of a higher T stage and higher Gleason score. 7) The total of 5 variants of HNF1B gene were found: 3 in colorectal carcinoma, 1 in HGSC and 1 in prostate carcinoma.

Concerning differential diagnosis the main significance of IHC expression of HNF1B could be in the tumors of the kidney, especially when differentiating between chRCC and renal oncocytoma. Another use could be in the tumors of the female genital system, however, the rather high percentage of expression found in our group of HGSCs may limit its use in this area. From the prognostic point of view the expression of HNF1B was significant especially in colorectal carcinoma, where decreased expression correlated with recurrence and worse prognosis. When considering the involvement of HNF1B in the pathogenesis of tumors, our data showed that in colorectal carcinoma, HGSC of the ovary, prostate carcinoma, ccRCC and chRCC HNF1B may act as a tumor suppressor, while in papRCC it could work as a protooncogene. The part of our work dealing with epigenetic alterations is significant especially for HGSC, where the confirmed high levels of methylation (in accordance with literature) suggest that methylation could represent a promising marker for early detection of HGSC.

## 9. LITERATURA

---

- Adalat S., Woolf A.S., Johnstone K.A., Wirsing A., Harries L.W., Long D.A., Hennekam R.C., Ledermann S.E., Rees L., van't Hoff W., Marks S.D., Trompeter R.S., Tullus K., Winyard P.J., Cansick J., Mushtaq I., Dhillon H.K., Bingham C., Edghill E.L., Shroff R., Stanescu H., Ryffel G.U., Ellard S. & Bockenhauer D. (2009) HNF1B mutations associate with hypomagnesemia and renal magnesium wasting. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1123-31.
- Akin I.B., Altay C., Guler E., Camlidag I., Harman M., Danaci M., Tuna B., Yorukoglu K. & Secil M. (2019) Discrimination of oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma using MRI. *Diagn Interv Radiol* **25**, 5-13.
- Alvelos M.I., Rodrigues M., Lobo L., Medeira A., Sousa A.B., Simao C. & Lemos M.C. (2015) A novel mutation of the HNF1B gene associated with hypoplastic glomerulocystic kidney disease and neonatal renal failure: a case report and mutation update. *Medicine (Baltimore)* **94**, e469.
- Amano Y., Mandai M., Yamaguchi K., Matsumura N., Kharma B., Baba T., Abiko K., Hamanishi J., Yoshioka Y. & Konishi I. (2015) Metabolic alterations caused by HNF1beta expression in ovarian clear cell carcinoma contribute to cell survival. *Oncotarget* **6**, 26002-17.
- Anik A., Catli G., Abaci A. & Bober E. (2015) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab* **28**, 251-63.
- Ayhan A., Akilli H. & Haberal N. (2019) The prognostic significance of stage I ovarian clear cell and endometrioid carcinomas arising from endometriotic cysts: is it a myth? *Arch Gynecol Obstet* **299**, 217-22.

- Banyai D., Sarlos D.P., Nagy A. & Kovacs G. (2018) Recalling Cohnheim's Theory: Papillary Renal Cell Tumor as a Model of Tumorigenesis from Impaired Embryonal Differentiation to Malignant Tumors in Adults. *Int J Biol Sci* **14**, 784-90.
- Baranova I., Kovarikova H., Laco J., Sedlakova I., Vrbacky F., Kovarik D., Hejna P., Palicka V. & Chmelarova M. (2020) Identification of a four-gene methylation biomarker panel in high-grade serous ovarian carcinoma. *Clin Chem Lab Med* **58**, 1332-40.
- Barbacci E., Chalkiadaki A., Masdeu C., Haumaitre C., Lokmane L., Loirat C., Cloarec S., Talianidis I., Bellanne-Chantelot C. & Cereghini S. (2004) HNF1beta/TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum Mol Genet* **13**, 3139-49.
- Bartu M., Dunder P., Nemejcova K., Ticha I., Hojny H. & Hajkova N. (2018) The Role of HNF1B in Tumorigenesis of Solid Tumours: a Review of Current Knowledge. *Folia Biol (Praha)* **64**, 71-83.
- Bas-Esteve E., Perez-Arguedas M., Guarda-Muratori G.A., Acien M. & Acien P. (2019) Endometriosis and ovarian cancer: Their association and relationship. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X* **3**, 100053.
- Bellanne-Chantelot C., Chauveau D., Gautier J.F., Dubois-Laforgue D., Clauin S., Beaufile S., Wilhelm J.M., Boitard C., Noel L.H., Velho G. & Timsit J. (2004) Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med* **140**, 510-7.
- Berndt S.I., Sampson J., Yeager M., Jacobs K.B., Wang Z., Hutchinson A., Chung C., Orr N., Wacholder S., Chatterjee N., Yu K., Kraft P., Feigelson H.S., Thun M.J., Diver W.R., Albanes D., Virtamo J., Weinstein S., Schumacher F.R., Cancel-Tassin G., Cussenot O., Valeri A., Andriole G.L., Crawford E.D., Haiman C., Henderson B., Kolonel L., Le Marchand L., Siddiq A., Riboli E., Travis R.C., Kaaks R., Isaacs W., Isaacs S., Wiley K.E., Gronberg H., Wiklund F., Stattin P., Xu J., Zheng S.L., Sun J., Vatten L.J., Hveem

- K., Njolstad I., Gerhard D.S., Tucker M., Hayes R.B., Hoover R.N., Fraumeni J.F., Jr., Hunter D.J., Thomas G. & Chanock S.J. (2011) Large-scale fine mapping of the HNF1B locus and prostate cancer risk. *Hum Mol Genet* **20**, 3322-9.
- Bockenbauer D. & Jaureguiberry G. (2016) HNF1B-associated clinical phenotypes: the kidney and beyond. *Pediatr Nephrol* **31**, 707-14.
- Bubancova I., Kovarikova H., Laco J., Ruzsova E., Dvorak O., Palicka V. & Chmelarova M. (2017) Next-Generation Sequencing Approach in Methylation Analysis of HNF1B and GATA4 Genes: Searching for Biomarkers in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* **18**.
- Buchner A., Castro M., Hennig A., Popp T., Assmann G., Stief C.G. & Zimmermann W. (2010) Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology* **76**, 507 e6-11.
- Cancer Genome Atlas Research N. (2015) The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* **163**, 1011-25.
- Carithers L.J., Ardlie K., Barcus M., Branton P.A., Britton A., Buia S.A., Compton C.C., DeLuca D.S., Peter-Demchok J., Gelfand E.T., Guan P., Korzeniewski G.E., Lockhart N.C., Rabiner C.A., Rao A.K., Robinson K.L., Roche N.V., Sawyer S.J., Segre A.V., Shive C.E., Smith A.M., Sobin L.H., Undale A.H., Valentino K.M., Vaught J., Young T.R., Moore H.M. & Consortium G.T. (2015) A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreserv Biobank* **13**, 311-9.
- Cereghini S. (1996) Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* **10**, 267-82.
- Clissold R.L., Fulford J., Hudson M., Shields B.M., McDonald T.J., Ellard S., Hattersley A.T. & Bingham C. (2018) Exocrine pancreatic dysfunction is common in hepatocyte nuclear factor 1beta-associated renal disease and can be symptomatic. *Clin Kidney J* **11**, 453-8.

- Clissold R.L., Hamilton A.J., Hattersley A.T., Ellard S. & Bingham C. (2015) HNF1B-associated renal and extra-renal disease-an expanding clinical spectrum. *Nat Rev Nephrol* **11**, 102-12.
- Conner J.R., Hirsch M.S. & Jo V.Y. (2015) HNF1beta and S100A1 are useful biomarkers for distinguishing renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma in FNA and core needle biopsies. *Cancer Cytopathol* **123**, 298-305.
- Cuff J. & Longacre T.A. (2012) Endometriosis does not confer improved prognosis in ovarian carcinoma of uniform cell type. *Am J Surg Pathol* **36**, 688-95.
- Cuff J., Salari K., Clarke N., Esheba G.E., Forster A.D., Huang S., West R.B., Higgins J.P., Longacre T.A. & Pollack J.R. (2013) Integrative bioinformatics links HNF1B with clear cell carcinoma and tumor-associated thrombosis. *PLoS One* **8**, e74562.
- D'Angelo A., Bluteau O., Garcia-Gonzalez M.A., Gresh L., Doyen A., Garbay S., Robine S. & Pontoglio M. (2010) Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development* **137**, 1573-82.
- Dan C., Zhang H., Zeng W., Huang L., Gong X., Li H., Yang E., Wang L. & Yao Q. (2019) HNF1B expression regulates ECI2 gene expression, potentially serving a role in prostate cancer progression. *Oncol Lett* **17**, 1094-100.
- De Simone V. & Cortese R. (1991) Transcriptional regulation of liver-specific gene expression. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 960-5.
- Debiais-Delpech C., Godet J., Pedretti N., Bernard F.X., Irani J., Cathelineau X., Cussenot O. & Fromont G. (2014) Expression patterns of candidate susceptibility genes HNF1beta and CtBP2 in prostate cancer: association with tumor progression. *Urol Oncol* **32**, 426-32.

- Desgrange A., Heliot C., Skovorodkin I., Akram S.U., Heikkila J., Ronkainen V.P., Miinalainen I., Vainio S.J. & Cereghini S. (2017) HNF1B controls epithelial organization and cell polarity during ureteric bud branching and collecting duct morphogenesis. *Development* **144**, 4704-19.
- Dubois-Laforgue D., Cornu E., Saint-Martin C., Coste J., Bellanne-Chantelot C., Timsit J. & Monogenic Diabetes Study Group of the Societe Francophone du D. (2017) Diabetes, Associated Clinical Spectrum, Long-term Prognosis, and Genotype/Phenotype Correlations in 201 Adult Patients With Hepatocyte Nuclear Factor 1B (HNF1B) Molecular Defects. *Diabetes Care* **40**, 1436-43.
- Edghill E.L., Bingham C., Ellard S. & Hattersley A.T. (2006) Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J Med Genet* **43**, 84-90.
- El-Khairi R. & Vallier L. (2016) The role of hepatocyte nuclear factor 1beta in disease and development. *Diabetes Obes Metab* **18 Suppl 1**, 23-32.
- Elliott K.S., Zeggini E., McCarthy M.I., Gudmundsson J., Sulem P., Stacey S.N., Thorlacius S., Amundadottir L., Gronberg H., Xu J., Gaborieau V., Eeles R.A., Neal D.E., Donovan J.L., Hamdy F.C., Muir K., Hwang S.J., Spitz M.R., Zanke B., Carvajal-Carmona L., Brown K.M., Australian Melanoma Family Study I, Hayward N.K., Macgregor S., Tomlinson I.P., Lemire M., Amos C.I., Murabito J.M., Isaacs W.B., Easton D.F., Brennan P., PanScan C., Barkardottir R.B., Gudbjartsson D.F., Rafnar T., Hunter D.J., Chanock S.J., Stefansson K. & Ioannidis J.P. (2010) Evaluation of association of HNF1B variants with diverse cancers: collaborative analysis of data from 19 genome-wide association studies. *PLoS One* **5**, e10858.
- Ferre S. & Igarashi P. (2019) New insights into the role of HNF-1beta in kidney (patho)physiology. *Pediatr Nephrol* **34**, 1325-35.



- Forbes S.A., Beare D., Gunasekaran P., Leung K., Bindal N., Boutselakis H., Ding M., Bamford S., Cole C., Ward S., Kok C.Y., Jia M., De T., Teague J.W., Stratton M.R., McDermott U. & Campbell P.J. (2015) COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* **43**, D805-11.
- Graham J.S., Kaye S.B. & Brown R. (2009) The promises and pitfalls of epigenetic therapies in solid tumours. *Eur J Cancer* **45**, 1129-36.
- Grisanzio C., Werner L., Takeda D., Awoyemi B.C., Pomerantz M.M., Yamada H., Sooriakumaran P., Robinson B.D., Leung R., Schinzel A.C., Mills I., Ross-Adams H., Neal D.E., Kido M., Yamamoto T., Petrozziello G., Stack E.C., Lis R., Kantoff P.W., Loda M., Sartor O., Egawa S., Tewari A.K., Hahn W.C. & Freedman M.L. (2012) Genetic and functional analyses implicate the NUDT11, HNF1B, and SLC22A3 genes in prostate cancer pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11252-7.
- Gudmundsson J., Sulem P., Steinthorsdottir V., Bergthorsson J.T., Thorleifsson G., Manolescu A., Rafnar T., Gudbjartsson D., Agnarsson B.A., Baker A., Sigurdsson A., Benediktsdottir K.R., Jakobsdottir M., Blondal T., Stacey S.N., Helgason A., Gunnarsdottir S., Olafsdottir A., Kristinsson K.T., Birgisdottir B., Ghosh S., Thorlacius S., Magnusdottir D., Stefansdottir G., Kristjansson K., Bagger Y., Wilensky R.L., Reilly M.P., Morris A.D., Kimber C.H., Adeyemo A., Chen Y., Zhou J., So W.Y., Tong P.C., Ng M.C., Hansen T., Andersen G., Borch-Johnsen K., Jorgensen T., Tres A., Fuertes F., Ruiz-Echarri M., Asin L., Saez B., van Boven E., Klaver S., Swinkels D.W., Aben K.K., Graif T., Cashy J., Suarez B.K., van Vierssen Trip O., Frigge M.L., Ober C., Hofker M.H., Wijmenga C., Christiansen C., Rader D.J., Palmer C.N., Rotimi C., Chan J.C., Pedersen O., Sigurdsson G., Benediktsson R., Jonsson E., Einarsson G.V., Mayordomo J.I., Catalona W.J., Kiemeny L.A., Barkardottir R.B., Gulcher J.R., Thorsteinsdottir U.,

- Kong A. & Stefansson K. (2007) Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet* **39**, 977-83.
- Harries L.W., Perry J.R., McCullagh P. & Crundwell M. (2010) Alterations in LMTK2, MSMB and HNF1B gene expression are associated with the development of prostate cancer. *BMC Cancer* **10**, 315.
- Heidet L., Decramer S., Pawtowski A., Moriniere V., Bandin F., Knebelmann B., Lebre A.S., Faguer S., Guignon V., Antignac C. & Salomon R. (2010) Spectrum of HNF1B mutations in a large cohort of patients who harbor renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 1079-90.
- Hindorf L.A., Gillanders E.M. & Manolio T.A. (2011) Genetic architecture of cancer and other complex diseases: lessons learned and future directions. *Carcinogenesis* **32**, 945-54.
- Hu Y.L., Zhong D., Pang F., Ning Q.Y., Zhang Y.Y., Li G., Wu J.Z. & Mo Z.N. (2013) HNF1b is involved in prostate cancer risk via modulating androgenic hormone effects and coordination with other genes. *Genet Mol Res* **12**, 1327-35.
- Huang W., Cheng X., Ji J., Zhang J. & Li Q. (2016) The Application Value of HNF-1beta Transcription Factor in the Diagnosis of Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* **35**, 66-71.
- Chaffer C.L., San Juan B.P., Lim E. & Weinberg R.A. (2016) EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **35**, 645-54.
- Chan S.C., Zhang Y., Shao A., Avdulov S., Herrera J., Aboudehen K., Pontoglio M. & Igarashi P. (2018) Mechanism of Fibrosis in HNF1B-Related Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* **29**, 2493-509.
- Chornokur G., Amankwah E.K., Davis S.N., Phelan C.M., Park J.Y., Pow-Sang J. & Kumar N.B. (2013) Variation in HNF1B and Obesity May Influence Prostate Cancer Risk in African American Men: A Pilot Study. *Prostate Cancer* **2013**, 384594.

- Ishibashi H., Takano M., Miyamoto M., Soyama H., Matsuura H., Aoyama T., Yoshikawa T., Kato K., Tsuda H. & Furuya K. (2017) Role of endometriosis as a prognostic factor for post-progression survival in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* **7**, 1027-31.
- Itamochi H., Kigawa J. & Terakawa N. (2008) Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci* **99**, 653-8.
- James D. Brierley M.K.G., Christian Wittekind (2018) *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*, Praha.
- Janky R., Binda M.M., Allemeersch J., Van den Broeck A., Govaere O., Swinnen J.V., Roskams T., Aerts S. & Topal B. (2016) Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* **16**, 632.
- Kalloger S.E., Kobel M., Leung S., Mehl E., Gao D., Marcon K.M., Chow C., Clarke B.A., Huntsman D.G. & Gilks C.B. (2011) Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Mod Pathol* **24**, 512-21.
- Kao Y.C., Lin M.C., Lin W.C., Jeng Y.M. & Mao T.L. (2012) Utility of hepatocyte nuclear factor-1beta as a diagnostic marker in ovarian carcinomas with clear cells. *Histopathology* **61**, 760-8.
- Kato N., Sasou S. & Motoyama T. (2006) Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol* **19**, 83-9.
- Ke-Sheng Wang D.O., Yue Pan, Chun Xu (2014) Common Genetic Variants in the HNF1B Gene Contribute to Diabetes and Multiple Cancers. *Austin Biomarkers & Diagnosis* **1**, 1-5.
- Kim H.J., Bae J.S., Lee J., Chang I.H., Kim K.D., Shin H.D., Han J.H., Lee S.Y., Kim W. & Myung S.C. (2011) HNF1B polymorphism associated with development of prostate cancer in Korean patients. *Urology* **78**, 969 e1-6.

- Kobel M., Kalloger S.E., Carrick J., Huntsman D., Asad H., Oliva E., Ewanowich C.A., Soslow R.A. & Gilks C.B. (2009) A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol* **33**, 14-21.
- Kobel M., Kalloger S.E., Huntsman D.G., Santos J.L., Swenerton K.D., Seidman J.D., Gilks C.B. & Cheryl Brown Ovarian Cancer Outcomes Unit of the British Columbia Cancer Agency V.B.C. (2010) Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* **29**, 203-11.
- Komiyama S., Aoki D., Katsuki Y. & Nozawa S. (2006) Proliferative activity of early ovarian clear cell adenocarcinoma depends on association with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **127**, 130-6.
- Kompatscher A., de Baaij J.H.F., Aboudehen K., Farahani S., van Son L.H.J., Milatz S., Himmerkus N., Veenstra G.C., Bindels R.J.M. & Hoenderop J.G.J. (2018) Transcription factor HNF1beta regulates expression of the calcium-sensing receptor in the thick ascending limb of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **315**, F27-F35.
- Kondi-Pafiti A., Papakonstantinou E., Iavazzo C., Grigoriadis C., Salakos N. & Gregoriou O. (2012) Clinicopathological characteristics of ovarian carcinomas associated with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* **285**, 479-83.
- Kountourakis P., Souglakos J., Gouvas N., Androulakis N., Athanasiadis A., Boukovinas I., Christodoulou C., Chrysou E., Dervenis C., Emmanouilidis C., Georgiou P., Karachaliou N., Katopodi O., Makatsoris T., Papakostas P., Pentheroudakis G., Pilpilidis I., Sgouros J., Tekkis P., Triantopoulou C., Tzardi M., Vassiliou V., Vini L., Xynogalos S., Xynos E., Ziras N. & Papamichael D. (2016) Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol* **29**, 18-23.

- Lau H.H., Ng N.H.J., Loo L.S.W., Jasmen J.B. & Teo A.K.K. (2018) The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver. *J Hepatol* **68**, 1033-48.
- Laurent-Puig P., Plomteux O., Bluteau O., Zinzindohoue F., Jeannot E., Dahan K., Kartheuser A., Chapusot C., Cugnenc P.H. & Zucman-Rossi J. (2003) Frequent mutations of hepatocyte nuclear factor 1 in colorectal cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* **124**, 1311-4.
- Lebrun G., Vasiliu V., Bellanne-Chantelot C., Bensman A., Ulinski T., Chretien Y. & Grunfeld J.P. (2005) Cystic kidney disease, chromophobe renal cell carcinoma and TCF2 (HNF1 beta) mutations. *Nat Clin Pract Nephrol* **1**, 115-9.
- Li J., Zhang Y., Gao Y., Cui Y., Liu H., Li M. & Tian Y. (2014) Downregulation of HNF1 homeobox B is associated with drug resistance in ovarian cancer. *Oncol Rep* **32**, 979-88.
- Liu Y., Kanyomse Q. & Xie Y. (2019) Tumor-suppressive activity of Hnf1beta in Wilms' tumor. *Biosci Biotechnol Biochem* **83**, 2008-15.
- Lokmane L., Haumaitre C., Garcia-Villalba P., Anselme I., Schneider-Maunoury S. & Cereghini S. (2008) Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* **135**, 2777-86.
- Lu W., Sun J., Zhou H., Wang F., Zhao C., Li K., Fan C., Ding G. & Wang J. (2020) HNF1B inhibits cell proliferation via repression of SMAD6 expression in prostate cancer. *J Cell Mol Med*.
- Madariaga L., Garcia-Castano A., Ariceta G., Martinez-Salazar R., Aguayo A., Castano L. & Spanish group for the study of H.N.F.B.m. (2019) Variable phenotype in HNF1B mutations: extrarenal manifestations distinguish affected individuals from the population with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Clin Kidney J* **12**, 373-9.

- Mandato V.D., Farnetti E., Torricelli F., Abrate M., Casali B., Ciarlini G., Pirillo D., Gelli M.C., Nicoli D., Grassi M., GB L.A.S. & Palomba S. (2015) HNF1B polymorphism influences the prognosis of endometrial cancer patients: a cohort study. *BMC Cancer* **15**, 229.
- Matsui A., Fujimoto J., Ishikawa K., Ito E., Goshima N., Watanabe S. & Semba K. (2016) Hepatocyte nuclear factor 1 beta induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition. *FEBS Lett* **590**, 1211-21.
- Nemejcova K., Cibula D. & Dunder P. (2015) Expression of HNF-1beta in cervical carcinomas: an immunohistochemical study of 155 cases. *Diagn Pathol* **10**, 8.
- Nemejcova K., Ticha I., Kleiblova P., Bartu M., Cibula D., Jirsova K. & Dunder P. (2016) Expression, Epigenetic and Genetic Changes of HNF1B in Endometrial Lesions. *Pathol Oncol Res* **22**, 523-30.
- Noto H., Osame K., Sasazuki T. & Noda M. (2010) Substantially increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic evidence in Japan. *J Diabetes Complications* **24**, 345-53.
- Okamoto T., Mandai M., Matsumura N., Yamaguchi K., Kondoh H., Amano Y., Baba T., Hamanishi J., Abiko K., Kosaka K., Murphy S.K., Mori S. & Konishi I. (2015) Hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Carcinog* **54**, 35-49.
- Okorn C., Goertz A., Vester U., Beck B.B., Bergmann C., Habbig S., Konig J., Konrad M., Muller D., Oh J., Ortiz-Bruchle N., Patzer L., Schild R., Seeman T., Staude H., Thumfart J., Tonshoff B., Walden U., Weber L., Zaniew M., Zappel H., Hoyer P.F. & Weber S. (2019) HNF1B nephropathy has a slow-progressive phenotype in childhood-with the exception of very early onset cases: results of the German Multicenter HNF1B Childhood Registry. *Pediatr Nephrol* **34**, 1065-75.

Omura Y., Yagi K., Honoki H., Iwata M., Enkaku A., Takikawa A., Kuwano T., Watanabe Y., Nishimura A., Liu J., Chujo D., Fujisaka S., Enya M., Horikawa Y. & Tobe K. (2019) Clinical manifestations of a sporadic maturity-onset diabetes of the young (MODY) 5 with a whole deletion of HNF1B based on 17q12 microdeletion. *Endocr J* **66**, 1113-6.

Painter J.N., O'Mara T.A., Batra J., Cheng T., Lose F.A., Dennis J., Michailidou K., Tyrer J.P., Ahmed S., Ferguson K., Healey C.S., Kaufmann S., Hillman K.M., Walpole C., Moya L., Pollock P., Jones A., Howarth K., Martin L., Gorman M., Hodgson S., National Study of Endometrial Cancer Genetics G., Consortium C., De Polanco M.M., Sans M., Carracedo A., Castellvi-Bel S., Rojas-Martinez A., Santos E., Teixeira M.R., Carvajal-Carmona L., Shu X.O., Long J., Zheng W., Xiang Y.B., Australian National Endometrial Cancer Study G., Montgomery G.W., Webb P.M., Scott R.J., McEvoy M., Attia J., Holliday E., Martin N.G., Nyholt D.R., Henders A.K., Fasching P.A., Hein A., Beckmann M.W., Renner S.P., Dork T., Hillemanns P., Durst M., Runnebaum I., Lambrechts D., Coenegrachts L., Schrauwen S., Amant F., Winterhoff B., Dowdy S.C., Goode E.L., Teoman A., Salvesen H.B., Trovik J., Njolstad T.S., Werner H.M., Ashton K., Proietto T., Otton G., Tzortzatos G., Mints M., Tham E., Rendocas, Hall P., Czene K., Liu J., Li J., Hopper J.L., Southey M.C., Australian Ovarian Cancer S., Ekici A.B., Ruebner M., Johnson N., Peto J., Burwinkel B., Marme F., Brenner H., Dieffenbach A.K., Meindl A., Brauch H., Network G., Lindblom A., Depreeuw J., Moisse M., Chang-Claude J., Rudolph A., Couch F.J., Olson J.E., Giles G.G., Bruinsma F., Cunningham J.M., Fridley B.L., Borresen-Dale A.L., Kristensen V.N., Cox A., Swerdlow A.J., Orr N., Bolla M.K., Wang Q., Weber R.P., Chen Z., Shah M., French J.D., Pharoah P.D., Dunning A.M., Tomlinson I., Easton D.F., Edwards S.L., Thompson D.J. & Spurdle A.B. (2015) Fine-mapping of the HNF1B multicancer locus identifies candidate variants that mediate endometrial cancer risk. *Hum Mol Genet* **24**, 1478-92.

- Pontoglio M. (2000) Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* **11 Suppl 16**, S140-3.
- Rebouissou S., Vasiliu V., Thomas C., Bellanne-Chantelot C., Bui H., Chretien Y., Timsit J., Rosty C., Laurent-Puig P., Chauveau D. & Zucman-Rossi J. (2005) Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* **14**, 603-14.
- Rezanejad H., Ouziel-Yahalom L., Keyzer C.A., Sullivan B.A., Hollister-Lock J., Li W.C., Guo L., Deng S., Lei J., Markmann J. & Bonner-Weir S. (2018) Heterogeneity of SOX9 and HNF1beta in Pancreatic Ducts Is Dynamic. *Stem Cell Reports* **10**, 725-38.
- Rios-Tamayo R., Lupianez C.B., Campa D., Hielscher T., Weinhold N., Martinez-Lopez J., Jerez A., Landi S., Jamroziak K., Dumontet C., Watek M., Lesueur F., Reis R.M., Marques H., Jurczynski A., Vogel U., Buda G., Garcia-Sanz R., Orciuolo E., Petrini M., Vangsted A.J., Gemignani F., Forsti A., Goldschmidt H., Hemminki K., Canzian F., Jurado M. & Sainz J. (2016) A common variant within the HNF1B gene is associated with overall survival of multiple myeloma patients: results from the IMMENSE consortium and meta-analysis. *Oncotarget* **7**, 59029-48.
- Ross-Adams H., Ball S., Lawrenson K., Halim S., Russell R., Wells C., Strand S.H., Orntoft T.F., Larson M., Armasu S., Massie C.E., Asim M., Mortensen M.M., Borre M., Woodfine K., Warren A.Y., Lamb A.D., Kay J., Whitaker H., Ramos-Montoya A., Murrell A., Sorensen K.D., Fridley B.L., Goode E.L., Gayther S.A., Masters J., Neal D.E. & Mills I.G. (2016) HNF1B variants associate with promoter methylation and regulate gene networks activated in prostate and ovarian cancer. *Oncotarget* **7**, 74734-46.
- Rougemont A.L. & Tille J.C. (2018) Role of HNF1beta in the differential diagnosis of yolk sac tumor from other germ cell tumors. *Hum Pathol* **81**, 26-36.



- Senkel S., Lucas B., Klein-Hitpass L. & Ryffel G.U. (2005) Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim Biophys Acta* **1731**, 179-90.
- Setiawan V.W., Haessler J., Schumacher F., Cote M.L., Deelman E., Fesinmeyer M.D., Henderson B.E., Jackson R.D., Vockler J.S., Wilkens L.R., Yasmeen S., Haiman C.A., Peters U., Le Marchand L. & Kooperberg C. (2012) HNF1B and endometrial cancer risk: results from the PAGE study. *PLoS One* **7**, e30390.
- Shen H., Fridley B.L., Song H., Lawrenson K., Cunningham J.M., Ramus S.J., Cicek M.S., Tyrer J., Stram D., Larson M.C., Kobel M., Consortium P., Ziogas A., Zheng W., Yang H.P., Wu A.H., Wozniak E.L., Woo Y.L., Winterhoff B., Wik E., Whittemore A.S., Wentzensen N., Weber R.P., Vitonis A.F., Vincent D., Vierkant R.A., Vergote I., Van Den Berg D., Van Altena A.M., Tworoger S.S., Thompson P.J., Tessier D.C., Terry K.L., Teo S.H., Templeman C., Stram D.O., Southey M.C., Sieh W., Siddiqui N., Shvetsov Y.B., Shu X.O., Shridhar V., Wang-Gohrke S., Severi G., Schwaab I., Salvesen H.B., Rzepecka I.K., Runnebaum I.B., Rossing M.A., Rodriguez-Rodriguez L., Risch H.A., Renner S.P., Poole E.M., Pike M.C., Phelan C.M., Pelttari L.M., Pejovic T., Paul J., Orlov I., Omar S.Z., Olson S.H., Odunsi K., Nickels S., Nevanlinna H., Ness R.B., Narod S.A., Nakanishi T., Moysich K.B., Monteiro A.N., Moes-Sosnowska J., Modugno F., Menon U., McLaughlin J.R., McGuire V., Matsuo K., Adenan N.A., Massuger L.F., Lurie G., Lundvall L., Lubinski J., Lissowska J., Levine D.A., Leminen A., Lee A.W., Le N.D., Lambrechts S., Lambrechts D., Kupryjanczyk J., Krakstad C., Konecny G.E., Kjaer S.K., Kiemeny L.A., Kelemen L.E., Keeney G.L., Karlan B.Y., Karevan R., Kalli K.R., Kajiyama H., Ji B.T., Jensen A., Jakubowska A., Iversen E., Hosono S., Hogdall C.K., Hogdall E., Hoatlin M., Hillemanns P., Heitz F., Hein R., Harter P., Halle M.K., Hall P., Gronwald J., Gore M., Goodman M.T., Giles G.G.,

Gentry-Maharaj A., Garcia-Closas M., Flanagan J.M., Fasching P.A., Ekici A.B., Edwards R., Eccles D., Easton D.F., Durst M., du Bois A., Dork T., Doherty J.A., Despierre E., Dansonka-Mieszkowska A., Cybulski C., Cramer D.W., Cook L.S., Chen X., Charbonneau B., Chang-Claude J., Campbell I., Butzow R., Bunker C.H., Brueggmann D., Brown R., Brooks-Wilson A., Brinton L.A., Bogdanova N., Block M.S., Benjamin E., Beesley J., Beckmann M.W., Bandera E.V., Baglietto L., Bacot F., Armasu S.M., Antonenkova N., Anton-Culver H., Aben K.K., Liang D., Wu X., Lu K., Hildebrandt M.A., Australian Ovarian Cancer Study G., Australian Cancer S., Schildkraut J.M., Sellers T.A., Huntsman D., Berchuck A., Chenevix-Trench G., Gayther S.A., Pharoah P.D., Laird P.W., Goode E.L. & Pearce C.L. (2013) Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat Commun* **4**, 1628.

Shigetomi H., Sudo T., Shimada K., Uekuri C., Tsuji Y., Kanayama S., Naruse K., Yamada Y., Konishi N. & Kobayashi H. (2014) Inhibition of cell death and induction of G2 arrest accumulation in human ovarian clear cells by HNF-1beta transcription factor: chemosensitivity is regulated by checkpoint kinase CHK1. *Int J Gynecol Cancer* **24**, 838-43.

Shim J.H., Lee H.C., Han S., Kang H.J., Yu E. & Lee S.G. (2013) Hepatocyte nuclear factor 1beta is a novel prognostic marker independent of the Milan criteria in transplantable hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis based on tissue microarrays. *Liver Transpl* **19**, 336-45.

Silva T.D., Vidigal V.M., Felipe A.V., JM D.E.L., Neto R.A., Saad S.S. & Forones N.M. (2013) DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett* **6**, 1687-92.

- Singh M.P., Rai S., Pandey A., Singh N.K. & Srivastava S. (2019) Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes & Diseases*.
- Specht E., Kaemmerer D., Sanger J., Wirtz R.M., Schulz S. & Lupp A. (2015) Comparison of immunoreactive score, HER2/neu score and H score for the immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Histopathology* **67**, 368-77.
- Spurdle A.B., Thompson D.J., Ahmed S., Ferguson K., Healey C.S., O'Mara T., Walker L.C., Montgomery S.B., Dermitzakis E.T., Australian National Endometrial Cancer Study G., Fahey P., Montgomery G.W., Webb P.M., Fasching P.A., Beckmann M.W., Ekici A.B., Hein A., Lambrechts D., Coenegrachts L., Vergote I., Amant F., Salvesen H.B., Trovik J., Njolstad T.S., Helland H., Scott R.J., Ashton K., Proietto T., Otton G., National Study of Endometrial Cancer Genetics G., Tomlinson I., Gorman M., Howarth K., Hodgson S., Garcia-Closas M., Wentzensen N., Yang H., Chanock S., Hall P., Czene K., Liu J., Li J., Shu X.O., Zheng W., Long J., Xiang Y.B., Shah M., Morrison J., Michailidou K., Pharoah P.D., Dunning A.M. & Easton D.F. (2011) Genome-wide association study identifies a common variant associated with risk of endometrial cancer. *Nat Genet* **43**, 451-4.
- Stevens V.L., Ahn J., Sun J., Jacobs E.J., Moore S.C., Patel A.V., Berndt S.I., Albanes D. & Hayes R.B. (2010) HNF1B and JAZF1 genes, diabetes, and prostate cancer risk. *Prostate* **70**, 601-7.
- Stiles C.E., Thuraisingham R., Bockenbauer D., Platts L., Kumar A.V. & Korbonits M. (2018) De novo HNF1 homeobox B mutation as a cause for chronic, treatment-resistant hypomagnesaemia. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* **2018**.

- Suaud L., Joseph B., Formstecher P. & Laine B. (1997) mRNA expression of HNF-4 isoforms and of HNF-1alpha/HNF-1beta variants and differentiation of human cell lines that mimic highly specialized phenotypes of intestinal epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 820-5.
- Sugiyama T., Kamura T., Kigawa J., Terakawa N., Kikuchi Y., Kita T., Suzuki M., Sato I. & Taguchi K. (2000) Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* **88**, 2584-9.
- Sun J., Zheng S.L., Wiklund F., Isaacs S.D., Purcell L.D., Gao Z., Hsu F.C., Kim S.T., Liu W., Zhu Y., Stattin P., Adami H.O., Wiley K.E., Dimitrov L., Sun J., Li T., Turner A.R., Adams T.S., Adolfsson J., Johansson J.E., Lowey J., Trock B.J., Partin A.W., Walsh P.C., Trent J.M., Duggan D., Carpten J., Chang B.L., Gronberg H., Isaacs W.B. & Xu J. (2008) Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12. *Nat Genet* **40**, 1153-5.
- Sun J.Z., Yang X.X., Hu N.Y., Li X., Li F.X. & Li M. (2011) Genetic Variants in MMP9 and TCF2 Contribute to Susceptibility to Lung Cancer. *Chin J Cancer Res* **23**, 183-7.
- Sun M., Tong P., Kong W., Dong B., Huang Y., Park I.Y., Zhou L., Liu X.D., Ding Z., Zhang X., Bai S., German P., Powell R., Wang Q., Tong X., Tannir N.M., Matin S.F., Rathmell W.K., Fuller G.N., McCutcheon I.E., Walker C.L., Wang J. & Jonasch E. (2017) HNF1B Loss Exacerbates the Development of Chromophobe Renal Cell Carcinomas. *Cancer Res* **77**, 5313-26.
- Suraweera N., Duval A., Reperant M., Vaury C., Furlan D., Leroy K., Seruca R., Iacopetta B. & Hamelin R. (2002) Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123**, 1804-11.

- Suzuki E., Kajita S., Takahashi H., Matsumoto T., Tsuruta T. & Saegusa M. (2015) Transcriptional upregulation of HNF-1beta by NF-kappaB in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression. *Lab Invest* **95**, 962-72.
- Szponar A., Yusenko M.V., Kuiper R., van Kessel A.G. & Kovacs G. (2011) Genomic profiling of papillary renal cell tumours identifies small regions of DNA alterations: a possible role of HNF1B in tumour development. *Histopathology* **58**, 934-43.
- Takenaka M., Kobel M., Garsed D.W., Fereday S., Pandey A., Etemadmoghadam D., Hendley J., Kawabata A., Noguchi D., Yanaihara N., Takahashi H., Kiyokawa T., Ikegami M., Takano H., Isonishi S., Ochiai K., Traficante N., Gadipally S., Semple T., Vassiliadis D., Amarasinghe K., Li J., Mir Arnau G., Okamoto A., Friedlander M., Bowtell D.D.L. & Australian Ovarian Cancer Study G. (2019) Survival Following Chemotherapy in Ovarian Clear Cell Carcinoma Is Not Associated with Pathological Misclassification of Tumor Histotype. *Clin Cancer Res* **25**, 3962-73.
- Terasawa K., Toyota M., Sagae S., Ogi K., Suzuki H., Sonoda T., Akino K., Maruyama R., Nishikawa N., Imai K., Shinomura Y., Saito T. & Tokino T. (2006) Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. *Br J Cancer* **94**, 914-21.
- Thomas G., Jacobs K.B., Yeager M., Kraft P., Wacholder S., Orr N., Yu K., Chatterjee N., Welch R., Hutchinson A., Crenshaw A., Cancel-Tassin G., Staats B.J., Wang Z., Gonzalez-Bosquet J., Fang J., Deng X., Berndt S.I., Calle E.E., Feigelson H.S., Thun M.J., Rodriguez C., Albanes D., Virtamo J., Weinstein S., Schumacher F.R., Giovannucci E., Willett W.C., Cussenot O., Valeri A., Andriole G.L., Crawford E.D., Tucker M., Gerhard D.S., Fraumeni J.F., Jr., Hoover R., Hayes R.B., Hunter D.J. &

- Chanock S.J. (2008) Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* **40**, 310-5.
- Ticha I., Hojny J., Michalkova R., Kodet O., Krkavcova E., Hajkova N., Nemejcova K., Bartu M., Jaks R., Dura M., Kanwal M., Martinikova A.S., Macurek L., Zemankova P., Kleibl Z. & Dunder P. (2019) A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci Rep* **9**, 17050.
- Tomassetti A., De Santis G., Castellano G., Miotti S., Mazzi M., Tomasoni D., Van Roy F., Carcangiu M.L. & Canevari S. (2008) Variant HNF1 modulates epithelial plasticity of normal and transformed ovary cells. *Neoplasia* **10**, 1481-92, 3p following 92.
- Tong Y., Qu Y., Li S., Zhao F., Wang Y. & Mu D. (2018) Cumulative evidence for relationships between multiple variants of HNF1B and the risk of prostate and endometrial cancers. *BMC Med Genet* **19**, 128.
- Tsuchiya A., Sakamoto M., Yasuda J., Chuma M., Ohta T., Ohki M., Yasugi T., Taketani Y. & Hirohashi S. (2003) Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* **163**, 2503-12.
- Verhave J.C., Bech A.P., Wetzels J.F. & Nijenhuis T. (2016) Hepatocyte Nuclear Factor 1beta-Associated Kidney Disease: More than Renal Cysts and Diabetes. *J Am Soc Nephrol* **27**, 345-53.
- von Brandenstein M., Schlosser M., Herden J., Heidenreich A., Storkel S. & Fries J.W.U. (2018) MicroRNAs as Urinary Biomarker for Oncocytoma. *Dis Markers* **2018**, 6979073.
- Wang C.C., Mao T.L., Yang W.C. & Jeng Y.M. (2013) Underexpression of hepatocyte nuclear factor-1beta in chromophobe renal cell carcinoma. *Histopathology* **62**, 589-94.

- Wang J., He C., Gao P., Wang S., Lv R., Zhou H., Zhou Q., Zhang K., Sun J., Fan C., Ding G. & Lan F. (2020) HNF1B-mediated repression of SLUG is suppressed by EZH2 in aggressive prostate cancer. *Oncogene* **39**, 1335-46.
- Wojdacz T.K., Dobrovic A. & Hansen L.L. (2008) Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* **3**, 1903-8.
- Yamamoto S., Tsuda H., Aida S., Shimazaki H., Tamai S. & Matsubara O. (2007) Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor 1beta in ovarian and endometrial clear-cell adenocarcinomas and nonneoplastic endometrium. *Hum Pathol* **38**, 1074-80.
- Yang R., Kerschner J.L. & Harris A. (2016) Hepatocyte nuclear factor 1 coordinates multiple processes in a model of intestinal epithelial cell function. *Biochim Biophys Acta* **1859**, 591-8.
- Yu D.D., Guo S.W., Jing Y.Y., Dong Y.L. & Wei L.X. (2015a) A review on hepatocyte nuclear factor-1beta and tumor. *Cell Biosci* **5**, 58.
- Yu D.D., Jing Y.Y., Guo S.W., Ye F., Lu W., Li Q., Dong Y.L., Gao L., Yang Y.T., Yang Y., Wu M.C. & Wei L.X. (2015b) Overexpression Of Hepatocyte Nuclear Factor-1beta Predicting Poor Prognosis Is Associated With Biliary Phenotype In Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep* **5**, 13319.
- Zhao Y., Liang J., Qi J.G., Yang N., Wu G., Lin Y.L., Cao J.Y., Wang Q. & Wang Q.C. (2015) Meta-analysis of the association between the HNF1B rs4430796 (A>G) polymorphism and risk of prostate cancer based on case-control studies. *Genet Mol Res* **14**, 7426-35.
- Zheng J., Liu X., Xue Y., Gong W., Ma J., Xi Z., Que Z. & Liu Y. (2017) TTBK2 circular RNA promotes glioma malignancy by regulating miR-217/HNF1beta/Derlin-1 pathway. *J Hematol Oncol* **10**, 52.

### Review Article

## The Role of HNF1B in Tumorigenesis of Solid Tumours: a Review of Current Knowledge

(HNF1B / tumorigenesis / immunohistochemistry)

M. BÁRTŮ, P. DUNDR, K. NĚMEJCOVÁ, I. TICHÁ, H. HOJNÝ, N. HÁJKOVÁ

Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic.

**Abstract.** Hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  is a transcription factor which plays a crucial role during ontogenesis in the differentiation of visceral endoderm from primitive endoderm, and is especially important for the normal development of the kidney, urogenital tract, gastrointestinal tract, liver, and pancreas. Despite the growing knowledge about the potential involvement of hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  in the process of carcinogenesis, the exact underlying mechanism that would explain its rather varied effects in different tumours has not been sufficiently investigated. Most of the data regarding the significance of hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  arise from genome-wide association studies and is concerned with the influence of single-nucleotide polymorphisms of hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  on either the increased or decreased susceptibility to certain types of cancer.

However, the influence of both the germinal and somatic mutations of this gene on the process of carcinogenesis is still poorly understood. According to current data, in some tumours hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  acts as a protooncogene, while in others as a tumour suppressor gene, although the reasons for this are not clear. The exact incidence of hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  mutations and the spectrum of tumours in which they may play a role in the process of carcinogenesis remain unknown. From the practical point of view, immunohistochemical expression of hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  can be used in differential diagnostics of certain tumours, especially clear cell carcinoma. In our article we review the current knowledge regarding the significance of hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  in carcinogenesis.

Received June 26, 2018. Accepted July 3, 2018.

This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic (Conceptual development of research organization 64165, General University Hospital in Prague, and project AZV 17-28404A), by Charles University (projects Progress Q28/LF1, UNCE 204065 and SVV 260367), by the Regional Development Fund (projects BBMRI-CZ No: EF16\_013/0001674, and OPVK (Research Laboratory of Tumour Diseases, CZ.2.16/3.1.00/24509).

Corresponding author: Michaela Bártů, Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Studničkova 2, 128 00, Prague 2, Czech Republic. E-mail: michaela.bartu@vfn.cz

Abbreviations: aa – amino acid, Atoh1 – atonal basic helix-loop-helix transcription factor 1, BAG1 – B-cell lymphoma 2-associated athanogene, CCA – clear cell adenocarcinoma, CCC – clear cell carcinoma, CD24 – cluster of differentiation 24, CD44 – cluster of differentiation 44, CHK1 – checkpoint kinase 1, CpA1 – carboxypeptidase A1, CRC – colorectal carcinoma, DDR1 – discoidin domain receptor tyrosine kinase 1, DFS – disease-free survival, EC – endometrial carcinoma, ERBB4 – human epidermal growth factor receptor 4, ESR1 – oestrogen receptor 1, GATA4 – GATA4 binding protein, GS – Gleason score, GWAS – genome-wide association study, HCC – hepatocellular carcinoma, HNF1A – hepatocyte nuclear factor 1- $\alpha$ , HNF1B – hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$ , Hnf6 – hepatocyte nuclear factor 6,

HSPD1 – heat-shock protein family D1, ICC – intrahepatic cholangiocarcinoma, IGFBP2 – insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP5 – insulin-like growth factor binding protein 5, IGF2 – insulin-like growth factor 2, IHC – immunohistochemistry, i1 – intron 1, i2 – intron 2, i4 – intron 4, i6 – intron 6, i8 – intron 8, Jag1 – jagged 1, MA – metanephric adenoma, MESH – Medical Subject Headings, MTSCC – mucinous tubular and spindle cell carcinoma, MODY – maturity-onset diabetes of the young, NCBI – National Center for Biotechnology Information, NF- $\kappa$ B – nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells, NLS – nuclear localization signal, NR4A1 – nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, OCCC – ovarian clear cell carcinoma, OR – odds ratio, OS – overall survival, PAWR – proapoptotic Wilms tumour 1 regulator, PCDH10 – protocadherin 10, PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma, PIK3CG – phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit  $\gamma$ , RCAD – renal cysts and diabetes, PDX1 – pancreatic and duodenal homeobox 1, POU – Pit-1/Oct-1/Unc-86 transcription factor, POU<sub>H</sub> – POU homeodomain, POU<sub>S</sub> – POU-specific domain, PTF1A – pancreas-associated transcription factor 1a, RAP2A – Ras-related protein Rap-2a, RCC – renal cell carcinoma, RCT – renal cell tumour, RT-PCR – real-time polymerase chain reaction, RUNX3 – runt-related transcription factor 3, SFRP5 – secreted frizzled related protein 5, SNP – single-nucleotide polymorphism, SOX9 – sex-determining region Y-related high mobility group box, TPD52 – tumour protein D52, UTR – untranslated region.

Folia Biologica (Praha) 64, 71-83 (2018)



## Introduction

Hepatocyte nuclear factor 1- $\beta$  (HNF1B, which is encoded by the *HNF1B* gene, also known as *TCF2*) is a transcription factor that plays a crucial role during ontogenesis in the differentiation of visceral endoderm from primitive endoderm (Barbacci et al., 2004; Cereghini, 1996). The HNF1B protein regulates expression of multiple genes involved in the cell cycle modulation, susceptibility to apoptosis, and glucose metabolism (Pontoglio, 2000; Suzuki et al., 2015; Tsuchiya et al., 2003). Despite the growing number of studies demonstrating the potential involvement of HNF1B in the process of carcinogenesis, the exact underlying mechanism that would explain its rather varied effects in different lesions of different anatomical settings has not been sufficiently investigated and is still poorly understood. Furthermore, even the very question of its basic oncogenic or tumour suppressor effects does not seem to have a unified answer, as HNF1B has been reported to act in either capacity in different lesions, or even in the same lesions when examined by different authors. Given the inconsistent findings, the aim of this study was to summarize the current and previous findings concerning the role of HNF1B in selected solid tumours, with a special focus on tumours of the female and male genital tract, the urinary tract, pancreatic cancer, and colorectal cancer.

## Material and Methods

A comprehensive review of all available literature published on the subject of HNF1B and its involvement in several selected solid tumours was performed, including the results of our studies focusing on HNF1B. The data was obtained through a database search using the MESH (Medical Subject Headings) terms “HNF1B”, “cancer”, “solid tumours”, “prostate cancer”, “colorectal cancer”, “female genital tract cancer”, “ovarian cancer”, “pancreatic cancer”, “SNP variants”, “cancer risk association”, “immunohistochemistry” and their combinations. Data was mined from the PubMed/MEDLINE, ScienceDirect, and Web of Science databases. Once a thorough search was performed, all the articles obtained were reviewed by the authors in order to determine their relevance. The results of the studies reviewed were not a criterion for exclusion, as both positive and negative associations needed to be taken into account. Studies were only excluded if they focused on *HNF1B* mutations leading to congenital anomalies of the kidneys and urinary tract, as only the association with cancer was relevant for this review. A strong emphasis was placed on studies with well-conducted methodology, based on large patient cohorts. Special care was taken to seek out studies focusing on full mutation analyses with a clearly defined clinical significance. Following analysis of all the available data, this paper undertook to comprehensively summarize the current state of knowledge of the involvement of HNF1B in the development and progression of selected solid tumours.

## HNF1B isoforms

*HNF1B* is located at chromosome 17q12 and comprises nine coding exons that span around 60 kb (MIM#189907). It is a member of the homeodomain-containing gene superfamily of transcription factors and encodes transcription factor Pit-1/Oct-1/Unc-86 (POU), which is involved in a number of signalling pathways and plays a significant role in endodermal development (Alvelos et al., 2015). The resulting protein has three functional domains: the DNA-binding domain (POU-specific domain and an atypical homeodomain, POU homeodomain), the transactivation domain, and the dimerization domain (El-Khairi and Vallier, 2016).

According to the current knowledge, there are three fully characterized HNF1B isoforms reported by NCBI and Ensemble databases. The wild-type transcript variant 1 (GenBank NM\_000458) is 2815 bp long and gives rise to 557 amino acid (aa) protein isoform 1 (UniProtKB P35680). The other two alternatively spliced transcripts are transcript variant 2 (2746 bp; GenBank NM\_001165923) encoding 531 aa long protein with a shorter form of exon 3, which, compared to isoform 1, lacks aa 183-208. The transcript variant 3 (2432 bp; GenBank NM\_001304286) codes for 457 aa long protein isoform 3, also with a shorter form of exon 3 compared to isoform 1 with missing aa 420-551 in the C-terminus, which leads to the skipping of exons 7 and 8. Other protein isoforms are reported in the Ensemble database, but the reference mRNA sequence is missing, as well as their more detailed analysis. The precise characterization of all HNF1B isoforms in different lesions is missing, and both the literature data and the comparison of isoform variants among the databases are equivocal. There is huge inconsistency in the literature regarding the described HNF1B isoforms, resulting from differently described sequences of particular protein isoforms, named 1, 2, and 3 or A, B, and C, in various investigated tissues. Previously described isoforms are inconsistent with the ones currently declared in the databases of NCBI and Ensemble according to the data gained from projects devoted to massive parallel sequencing of genomes and transcriptomes, which is probably based on more accurate data. A comprehensive schematic diagram of the current HNF1B transcripts and their domains is provided in Fig. 1.

The expression of the HNF1B protein is altered in several tumour types, and both down- and up-regulation has been described thus far based on the tumour type. However, only one study analysed expression of particular mRNA HNF1B transcripts and noted a switch in the expression of HNF1B transcripts in prostate cancer tissues compared to non-malignant prostate tissue (Harries et al., 2010). In this study, the authors described changes in the expression of the B form and C form comparing 39 non-malignant benign prostatic hyperplasia samples and 21 prostate adenocarcinoma samples. However, the impact of this work is questionable, since the C variant (RefSeq NM\_006481) was not proved to exist and in the

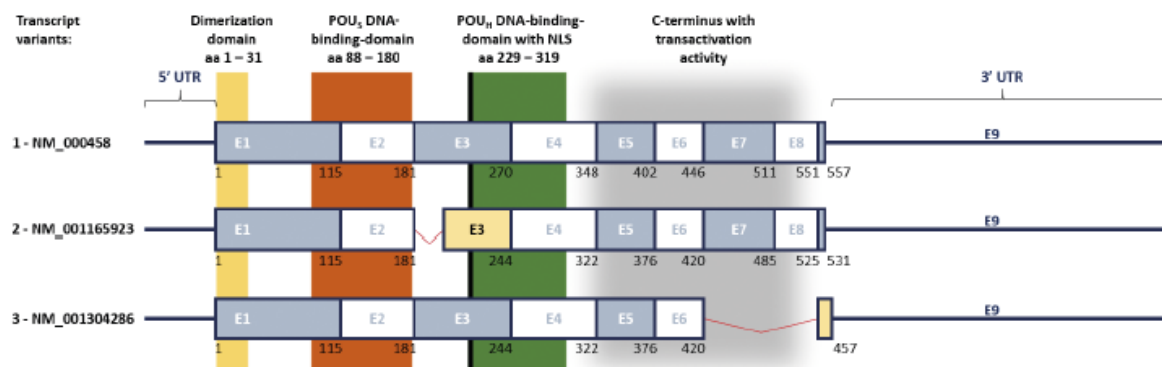


Fig. 1. Schematic diagram of the HNF1B transcripts (according to the RefSeq database)

The blue and white boxes illustrate the coding parts of reference exons, with the amino acid (aa) numbers indicated below the corresponding exons. The yellow boxes represent alternative exons. The yellow, brown, black, green, and grey areas illustrate the functional domains across the HNF1B transcripts. The lengths of exons are represented proportionally to scale. Transcript 2 lacks 26 aa (78 bp) at the 5' end of exon 3. Transcript 3 lacks the entire exons 7 and 8, and contains an alternative STOP codon in exon 9 due to a frame-shift (110 bp after the original STOP codon). Abbreviations: UTR – untranslated region, NLS – nuclear localization signal, POU<sub>D</sub> – POU-specific domain, POU<sub>H</sub> – POU homeodomain.

NCBI database was permanently suppressed. Data about mRNA expression of the individual HNF1B transcripts is still missing.

### Germline *HNF1B* mutations

Germline mutations in the *HNF1B* gene are linked with a number of diseases associated with defects in kidney development, kidney and liver disorders, pancreatic atrophy, genital malformations, a complex syndrome known as renal cysts and diabetes (RCAD), and maturity-onset diabetes of the young type 5 (MODY5) or neonatal diabetes (Bellanne-Chantelot et al., 2004; Edghill et al., 2006; Lokmane et al., 2008; Adalat et al., 2009). Mutations in *HNF1B* have also been associated with hypomagnesemia and renal magnesium wasting, suggesting that HNF1B plays a role in both nephrogenesis and maintenance of renal tubular functions (Adalat et al., 2009). Other described associated phenotypes include autism, epilepsy, gout, and primary hyperparathyroidism. However, the precise description of germline mutations of *HNF1B* and associated non-neoplastic diseases is out of the scope of this review. With respect to the association of *HNF1B* germline mutations and tumours, only rare (Lebrun et al., 2005; Rebouissou et al., 2005) case studies describing cases of chromophobe renal carcinoma associated with a combination of mono-allelic germline and somatic mutations have been published (Clissold et al., 2015; Bockenbauer and Jaureguierry, 2016; Verhave et al., 2016).

### Somatic *HNF1B* mutations

According to the results of our comprehensive search, so far no data showing somatic variants in the coding sequence of the *HNF1B* gene in different types of cancer

(including pancreatic, prostate, kidney and colorectal cancer) has been published, as a vast majority of the reviewed studies focus on analysing the intronic sequences and potentially significant single-nucleotide polymorphisms (SNPs). The SNPs of highest significance according to the literary data are summarized in Table 1, along with their location in the *HNF1B* gene. Alterations detected in tumour samples are collected in the cosmic database, including data from peer-reviewed published variants or from large systematic screen studies. Some alterations of the *HNF1B* gene have been described, including mutations, copy number variations, and methylations in different types of tumours. However, the information about the somatic or hereditary origin is often missing, and just a few of these were confirmed to be somatic (Forbes et al., 2015). In our recent study, screening of genetic variants in the whole coding sequences of *HNF1B* revealed four mutations in 30 endometrioid carcinomas and one missense variant among 12 ovarian clear cell carcinomas (OCCC) (Nemejcova et al., 2015a). With the exception of these, there are no other studies focusing on the genetic changes of *HNF1B* in solid tumours.

### A new potential biomarker of selected solid cancers

The genetic and epigenetic changes of *HNF1B* apparently play a pleiotropic role in tumorigenesis. Surprisingly, despite the growing knowledge of the importance of *HNF1B* SNPs in several cancer types, little is known about the mutations of this gene in various tumours, except for some SNPs in the non-coding intronic sequences of the *HNF1B* loci associated with the risk of kidney cancer (Rebouissou et al., 2005), endometrial cancer (Setiawan et al., 2012; Painter et al., 2015), and ances-

Table 1. Summarization of the *HNF1B* SNPs with the highest reported significance in the literary data, with their location in the *HNF1B* gene and the studied cohort where they were of statistical significance concerning their effect on carcinogenesis

SNP	Location in <i>HNF1B</i>	Chromosome 17 position, GRCh37	Studied cohort	References
rs4430796	intron 2	g.36098040G>A	endometrial cancer	Spurdle et al., 2011; Setiawan et al., 2012; Mandato et al., 2015
			ovarian clear cell carcinoma	Shigetomi et al., 2014
			prostate cancer	Sun et al., 2008; Thomas et al., 2008; Elliott et al., 2010; Harries et al., 2010; Berndt et al., 2011; Kim et al., 2011; Grisanzio et al., 2012; Chomokur et al., 2013; Hu et al., 2013; Zhao et al., 2015
rs757210	intron 2	g.36096515T>C/G	ovarian cancer	Ross-Adams et al., 2016
rs7501939	intron 1	g.36101156T>C	prostate cancer	Elliott et al., 2010; Kim et al., 2011; Chomokur et al., 2013
rs11649743	intron 4	g.36074979G>A	prostate cancer	Harries et al., 2010; Sun et al., 2008
rs7405696	intron 1	g.36102035G>C	prostate cancer	Berndt et al., 2011; Kim et al., 2011
rs4794758	intron 4	g.36080428C>T	prostate cancer	Berndt et al., 2011
rs1016990	intron 4	g.36088915G>C	prostate cancer	Berndt et al., 2011
rs3094509	intron 6	g.36062299A>G	prostate cancer	Berndt et al., 2011
rs11868513	intron 8	g.36052692G>A	prostate cancer	Kim et al., 2011
rs2074429	intron 6	g.36061297C>T	prostate cancer	Kim et al., 2011

try-specific *HNF1B* variants associated with prostate cancer (Berndt et al., 2011; Hindorff et al., 2011). There is also emerging evidence about the involvement of *HNF1B* in pancreatic cancer, while for colorectal cancer no relationship has been confirmed as yet (Elliott et al., 2010; Janky et al., 2016).

Rather than somatic variants in cancer tissues, what has been the focus of several studies are epigenetic changes, pointing to the complex nature of *HNF1B*'s influence. Epigenetic silencing of the *HNF1B* gene has been reported in several types of human cancers, including breast cancer, colorectal carcinoma (CRC), and ovarian cancer (Bubancova et al., 2017). For example, the development of sporadic colorectal cancer has been traditionally described as the result of accumulated genetic and epigenetic alterations, and studies have suggested that the common event in the carcinogenesis of CRC is the association of global hypomethylation with discrete hypermethylation at the promoter regions of various specific genes. *HNF1B* was one of the five genes that had the highest average hypermethylation percentage (50 %) in the test group of CRC, and the authors suggest that DNA methylation may serve as a non-invasive epigenetic marker of this tumour (Silva et al., 2013). The other hypermethylated genes included *RUNX3* (58.9 %), *PCDH10* (55.5 %), *SFRP5* (52.1 %), and *IGF2* (50.4 %).

The exact mechanism by which *HNF1B* participates in the process of cancerogenesis is unknown and probably differs in various types of tumours. In one study, knockdown of *HNF1B* in OCCC led to induction of apoptosis (Tsuchiya et al., 2003). This correlates with the results of a recent study showing that up-regulation of

*HNF1B* by inflammatory cytokine NF- $\kappa$ B/p65 decreases OCCC susceptibility to apoptosis (Suzuki et al., 2015). Depending on the relevant genetic and epigenetic changes, *HNF1B* can probably serve as either a tumour suppressor gene or an oncogene in different cancers. It has been shown that down-regulation of *HNF1B* in clear cell renal cell carcinoma and prostate carcinoma is associated with tumour progression and poor prognosis (Buchner et al., 2010; Noto et al., 2010).

A different situation is present in OCCC. We and others have found that the promoter of *HNF1B* in OCCC is typically unmethylated and gene expression is increased compared with other ovarian cancer types (Tsuchiya et al., 2003; Shen et al., 2013; Nemejcova et al., 2015a). In our study, we have not identified any methylated case in a group of 15 OCCCs. In contrast, we detected methylation of the *HNF1B* gene promoter in 4/30 endometrioid carcinoma samples (Nemejcova et al., 2015a). Methylation of the *HNF1B* gene promoter was also found in some cancer cell lines derived from pancreatic, colorectal, gastric, and ovarian tumours (Terasawa et al., 2006). All of these diverse findings support the suggestion that *HNF1B* may in fact represent one of the emerging "lineage-dependent" oncogenes, which while acting as master transcriptional regulators in normal cell lines show abnormal expression in tumours derived from these lines (Cuff et al., 2013). In a cancerous setting, their expression favours tumour survival.

The specific mechanisms through which *HNF1B* exerts its influence are yet to be fully uncovered. Some authors have termed it to be a pro-differentiation factor, which in healthy tissues suppresses the epithelial-mes-

enchymal transition and has potent tumour-suppressive activity (Ross-Adams et al., 2016). In tissues that have undergone malignant transformation, *HNF1B* was, however, suggested as a new oncogene inducing the cancerous phenotype (which was enhanced by co-expression of *ERBB2*) and activating epithelial-mesenchymal transition and formation of invasive phenotypes (Matsui et al., 2016). Other suggestions are related to *HNF1B*'s association with stem/progenitor cells – several studies have hypothesized that *HNF1B* could regulate expression of the genes associated with these cells. For instance, *HNF1B* was reported to activate the *CD24* gene (recently identified as a marker of renal progenitor population) in OCCC, osteopontin (associated with liver progenitors), and *CD44* (associated with cancer stem cells in various types of tumours) (Yu et al., 2015).

### Female genital system

The role of *HNF1B* SNPs in the development and risk of endometrial carcinoma (EC) has already been established, especially demonstrating the relationship between SNP rs4430796 (located in the intron 2 (i2) of *HNF1B*, also known as rs17626333 or rs58756954) and a decreased risk of endometrial cancer (Spurdle et al., 2011; Setiawan et al., 2012). In recent years, new data has emerged focusing on the relationship between *HNF1B* and prognosis of endometrial cancer. One study analysing association between the rs4430796 polymorphism and overall survival (OS) in 191 patients with endometrial cancer found rs4430796 (particularly the GG genotype) to be an independent risk factor for OS in EC patients (with the GG genotype showing the worst prognosis) (Mandato et al., 2015). Interestingly, this study demonstrated a significant interaction between rs4430796 and the success of adjuvant therapy, as the polymorphism was found to be related to OS only in patients who received a combined treatment with both radiotherapy and chemotherapy. These findings therefore suggest that rs4430796 could play a key role in tumour chemosensitivity and represent a useful predictive marker capable of distinguishing the patient population that would profit from the administration of a sensitization agent (as the presence of the A allele of rs4430796 in EC patients treated with chemotherapy may be responsible for an increased response to therapy). With the G allele being named as a possible culprit for the reduced chemosensitivity through *HNF1B* overexpression, it could be useful in the future to select those patients who are candidates for chemotherapy and adjust the therapy options accordingly. Some of the suggested explanations for these results are connected to the effect of *HNF1B* overexpression on some of the key regulators of the cell cycle, especially the aberrant retention of the G2 checkpoint. This conclusion is further supported by similar results reported in the setting of OCCC, where the overexpression of *HNF1B* may also cause aberrant retention of the G2 checkpoint, leading to chemoresistance of this particular tumour. This study demonstrated

chemosensitization by a *CHK1* inhibitor in CCA (Shigetomi et al., 2014).

Another SNP associated with ovarian cancer risk is rs757210 (located in i2, also known as rs3786124 or rs60456671), which was linked to increased promoter methylation in high-grade serous carcinoma of the ovary and also to increased *HNF1B* expression in OCCC (Ross-Adams et al., 2016).

In regard to protein expression, *HNF1B* was identified in 2003 as the first positive, relatively specific immunohistochemical marker of OCCC (Tsuchiya et al., 2003). An example of immunohistochemical evaluation of *HNF1B* in selected tumours is provided in Fig. 2. Recently, one study suggested that the association of *HNF1B* with a clear cell phenotype might reflect derivation from the secretory endometrium (Cuff et al., 2013). Since the first implication of *HNF1B*, its expression in non-neoplastic tissue and neoplasms of the female genital tract has been analysed in several studies (Kato et al., 2006; Yamamoto et al., 2007; Kato and Motoyama, 2009; Park et al., 2011; Kenny et al., 2012). These studies analysed *HNF1B* expression in endometriosis, normal endometrium, and lesions and tumours of the cervix and ovary. Most of the early studies found that the expression of *HNF1B* is mostly restricted to clear cell carcinoma (CCC) (Tsuchiya et al., 2003; Kato et al., 2006; Yamamoto et al., 2007; Ye et al., 2016). However, more recent studies have described *HNF1B* expression not only in CCC, but also in other tumour types including serous, endometrioid, and mucinous carcinomas and most types of borderline tumours (Tomassetti et al., 2008; Kalloger et al., 2011; Park et al., 2011; Fadare and Liang, 2012). In our study, we have recently described expression of *HNF1B* in cervical adenocarcinomas, and we have also observed its expression in atypical polypoid adenomyomas of the uterus (Nemejcova et al., 2015a, b).

Furthermore, down-regulation of *HNF1B* may contribute to drug resistance in ovarian cancer, which was suggested by a bioinformatic analysis of the mRNA expression data from online databases of ovarian cancer cases and in platinum-resistant ovarian cancer cells (Li et al., 2014). This study also suggested several protein/gene, protein/protein, or gene/gene partners that were also proved to be involved in drug resistance in cancer.

In the endometrial lesions, ours and other recent studies have found expression of *HNF1B* in some cases of endometriosis and in normal endometrium, especially in the secretory phase or gestational state (Yamamoto et al., 2007; Kato and Motoyama, 2009; Nemejcova et al., 2015a). Based on these results, *HNF1B* is not a specific marker of CCC and can be commonly found in other non-tumour and tumour lesions. However, among the tumours, strong expression of *HNF1B* is usually found in CCC only. In our study, we observed differing *HNF1B* expression in ECs depending on the degree of tumour differentiation (Nemejcova et al., 2016). Poorly differentiated (grade 3) ECs seldom express *HNF1B* compared with well or moderately differentiated (grade 1 or 2) ECs.

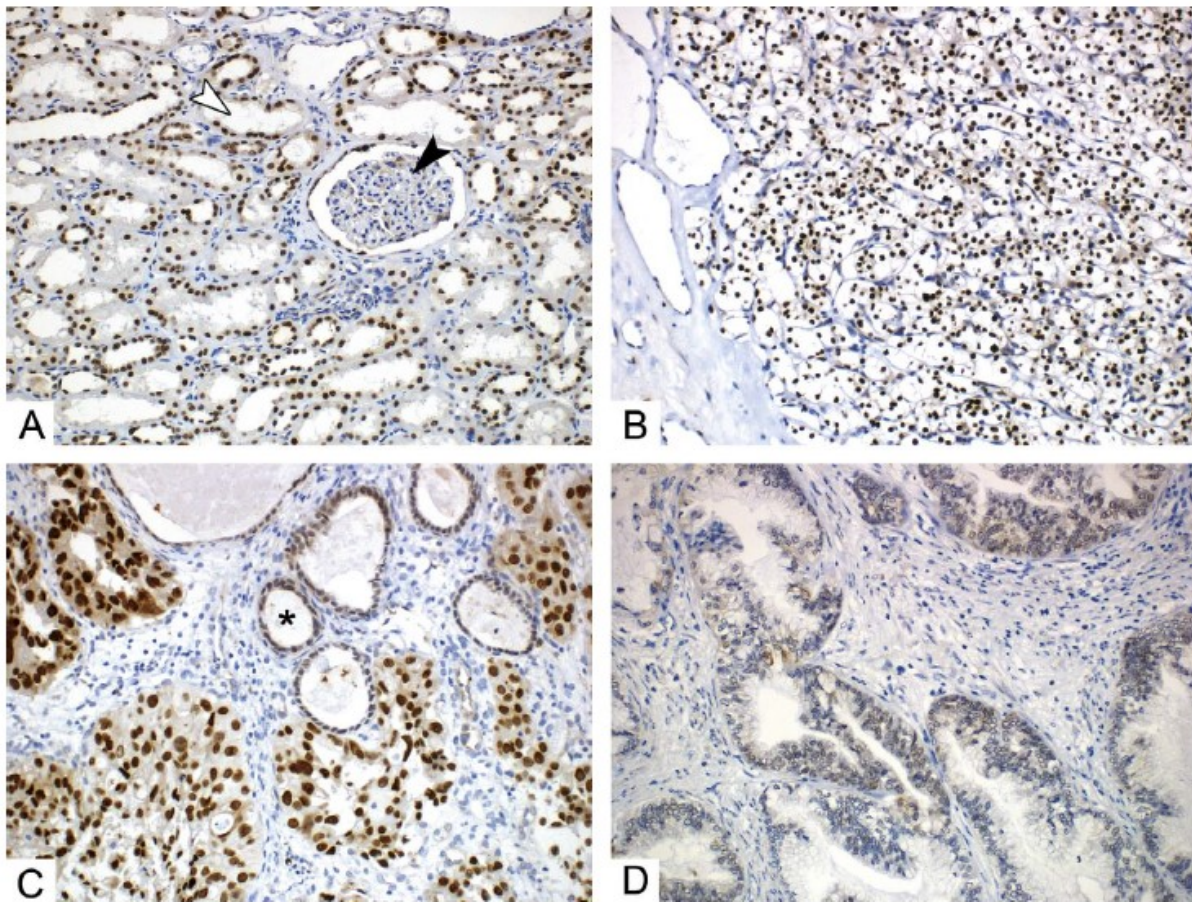


Fig. 2. Immunohistochemical evaluation of HNF1B expression in various lesions

(A) Normal renal parenchyma, showing strong diffuse nuclear positivity in tubular cells (white arrow). Note the negativity of the glomerulus (black arrow) (200 $\times$ ). (B) Clear cell renal cell carcinoma demonstrating diffuse, strong nuclear positivity of the tumour cells (200 $\times$ ). (C) Clear cell endometrial carcinoma. Note the strong nuclear positivity of HNF1B in tumour cells when compared to the weak nuclear positivity of the atrophic endometrial glands (black asterisk) (200 $\times$ ). (D) Endometrioid endometrial carcinoma with mucinous differentiation. Only a portion of the tumour cells show weak nuclear HNF1B positivity (200 $\times$ ).

### Colorectal cancer

HNF1B plays a significant role in the terminal differentiation and cell fate commitment of intestinal epithelial cells, where it works together with HNF1A in directly controlling expression of *Jag1* and *Atoh1* upstream of the Notch pathway (D'Angelo et al., 2010). In colorectal carcinoma, only some epigenetic alterations of *HNF1B* were found, with the conclusion that this marker may be used as a biomarker for detection of the early stage of colorectal cancer, but its expression has not yet been investigated (Silva et al., 2013). The significance of HNF1B expression in colorectal cancer was also evaluated as a part of collaborative analysis of data from 19 genome-wide association studies (GWAS) focusing on a number of diverse cancers (prostate cancer, colorectal cancer, breast cancer, lung and pancreatic cancer, melanoma); however, for the two potentially significant *HNF1B* SNPs (*rs4430796* and *rs7501939*, located in *i2* and *i1*, respectively), there was no statistically sig-

nificant association (Elliott et al., 2010). Prostate cancer was the only malignancy that has shown a significant relationship with these two *HNF1B* SNPs.

### Pancreatic cancer

HNF1B is one of the transcription factors that take part in directing differentiation of pre-pancreatic foregut endodermal cells into pancreatic progenitors via sequential activation of the *Hnf1b* – *Hnf6* – *Pdx1* cascade (Poll et al., 2006). HNF1B thus controls pancreatic morphogenesis, and its experimental early deletion leads to a reduced pool of pancreatic multipotent progenitor cells as a result of increased apoptosis and decreased cellular proliferation (De Vas et al., 2015). HNF1B has also been described as one of the molecular markers of pancreatic progenitor cells, along with *CpA1* and *Sox9* (Pinho et al., 2011). It has also been suggested that HNF1B plays a critical role in the development and differentiation of

at least the dorsal part of the pancreas, as agenesis of the pancreatic body and tail are both parts of the systemic disease phenotype in *HNF1B* mutation carriers (Haldorsen et al., 2008).

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is still relatively poorly understood at the genetic level. However, according to a recent study based on 27 microdissected surgical samples, there are three distinct molecular subtypes of PDAC (classical, exocrine-like, and quasi-mesenchymal) associated with type-specific gene signatures, which have been defined as PDAssign (Collisson et al., 2011). The authors also provide evidence for the clinical outcome and therapeutic response differences between these subtypes, with the classical subtype being associated with best survival, while the quasi-mesenchymal subtype showed the worst survival.

The prognostic relevance of molecular subtypes of PDAC was subsequently recently confirmed on a larger cohort of samples (whole tumour tissue obtained from 118 surgically resected PDAC) and possible master regulators were evaluated, naming *HNF1B* as a good candidate master regulator of pancreatic differentiation (Janky et al., 2016). In this study, the immunohistochemical expression of HNF1B in PDAC and normal pancreatic tissue was assessed. While both the normal acinar parenchyma and ductal cells showed clear nuclear staining, a gradual loss of nuclear expression was observed through the well-differentiated and poorly differentiated PDAC (correlating to the recorded down-regulation of HNF1B in tumour samples). The samples of well-differentiated PDAC demonstrated low expression of HNF1B, with minimal to no expression observed in poorly differentiated pancreatic ductal adenocarcinoma. The malignant ductal cells of the pancreas therefore lose expression of HNF1B at the protein level, suggesting that *HNF1B* may play a role as a tumour suppressor in pancreatic cancer.

Similar results concerning HNF1B expression in pancreatic tumours were also reported in another study dealing with the master regulatory genes of pancreatic embryonic development (Kondratyeva et al., 2017). In their work the authors studied 21 samples of pancreatic tumours of various histogenesis and found that compared to samples of normal pancreatic tissue, the tumour samples showed significantly reduced expression of *HNF1B* and other master regulatory genes. For *HNF1B*, this reduction is linked to promoter hypermethylation. The authors further stated that *HNF1B*, along with *SOX9*, *GATA4*, *PDX1* and *PTF1a*, form a single regulatory module with complex interregulatory interactions, all involved in the regulation and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. The fact that the expression suppression was observed in all the mentioned master regulatory genes leads to the proposition that these may in fact either all be required to work together in order to sustain the cell identity of the tumour cell progenitor, or that they act in a hierarchical order, with one gene controlling the expression of the others in determining the malignant transformation of pancreatic cells.

## Prostate cancer

Prostate cancer susceptibility is one of the most heritable (with genetic factors being estimated to account for 42 % of the risk), and with the increasing availability of GWAS the number of reported risk associations is growing steadily. To date, over 40 risk loci with a strong association with prostate cancer have been reported (Grisanzio et al., 2012). Several of these loci are located at the 17q12 chromosome, where *HNF1B* is placed, and therefore have been the focus of attention of studies dealing with prostate cancer for more than a decade. However, despite the large number of published results (often based on tremendously large patient cohorts) the conclusions remain largely inconsistent. There is no doubt that several intron-situated SNPs have been proved to be statistically significantly associated with prostate cancer, although their role and clinical meaning are often either unclear or not explained at all. The reported associations also seem to differ significantly concerning the authors' conclusions about the biological significance of their findings, as will be discussed below, the same SNPs are frequently reported as either being associated with increased prostate cancer susceptibility or as a protective factor, further underlying the complexity of this issue.

The most commonly studied *HNF1B* SNP in association with prostate cancer is rs4430796 (located in i2), which also well represents the significant differences between the published results. Although several GWAS reported the SNP variant rs4430796 as the most significant in men of European ancestry (a finding that was later confirmed in a study of Japanese men as well), the significance of this variant does not seem to be consistent at all. Some authors describe it as a protective factor leading to a decreased risk of prostate cancer development (Thomas et al., 2008; Elliott et al., 2010; Berndt et al., 2011; Kim et al., 2011; Chornokur et al., 2013; Zhao et al., 2015), others report it as being associated with increased prostate cancer susceptibility (Sun et al., 2008; Grisanzio et al., 2012; Hu et al., 2013). Additional studies confirmed the significance of rs4430796 and named the *HNF1B* intronic variants rs11649743 (intron 4; i4), rs7405696 (i1), rs4794758 (i4), rs1016990 (i4), and rs3094509 (i6) as the best model for risk in this region (Sun et al., 2008; Thomas et al., 2008; Harries et al., 2010; Berndt et al., 2011). However, the inconsistencies in the estimated biological significance of these remain. For instance, SNP variant rs7405696 is reportedly associated both with an increased odds ratio (OR) (Berndt et al., 2011) and with a decreased OR as a protective factor (Kim et al., 2011). Similarly, rs7501939 was associated with both increased (2.42 in men of African American descent) and decreased (0.71) ORs as well (Kim et al., 2011; Chornokur et al., 2013). Interestingly, one study suggested that *HNF1B* rs7501939 (i1) was associated with increased prostate cancer risk exclusively in obese men of African American descent, concluding that variations in *HNF1B* may influence

prostate cancer risk in this specific population (Chornokur et al., 2013). As the burden of prostate cancer varies between certain racial and ethnic groups (with African American men demonstrating 1.6 times higher incidence and 2–3 times higher mortality rates), this finding is of particular interest. As these authors further discuss, studies that investigated prostate cancer risk and its association with *HNF1B* SNPs report mixed results when stratified by ethnicity.

A statistically significant association was also reported in Korean prostate cancer patients, in a study naming 14 SNPs and three haplotypes that were significantly associated with prostate cancer risk (Kim et al., 2011). Nine of these SNPs were associated with a lower risk of prostate cancer and five SNPs were linked with an increased risk of the disease, all located in the intronic region of *HNF1B*. Of these, one SNP in particular (rs11868513, located in *HNF1B* i8) was more frequently found in patients with tumours of a greater stage, while two SNPs (rs4430796, rs2074429, located in i2 or i6, respectively) and one haplotype (Block3\_h1) were more common in patients with a higher Gleason score ( $GS \geq 7$ ) than in those with  $GS < 6$ . At the moment, there is no single plausible explanation for these discrepancies, other than that the association between different SNP variants in the 17q12 region and the development of prostate cancer exists, but it appears to be highly complex and it is probable that the reported SNPs work in a combined fashion rather than on their own. This would be in accordance with the observation of Berndt et al., who stated that the significance of *HNF1B* SNPs increases with an increased number of risk alleles (with OR of 0–2 risk alleles being set as 1.0 and for a combination of 8–10 risk alleles increased to 1.88) (Berndt et al., 2011).

Although the biological mechanism by which *HNF1B* may be implicated in increased prostate cancer risk has not yet been determined, differential levels of *HNF1B* expression have been associated with prostate cancer recurrence (Glinsky et al., 2004). A number of recent forays into the topic of *HNF1B* and its functional role and mechanistic effects highly support the idea of pleiotropy as the driving underlying force. One recent genetic and functional analysis performed by Grisanzio et al. (2012) on one of the largest cohorts of European American, African American, and Japanese men also suggests that the suppression of *HNF1B* expression affects cellular phenotypes associated with tumour-related properties (colony formation, proliferation, viability) of prostate cancer cells, implying other mechanisms through which *HNF1B* may contribute to prostate cancer pathogenesis. One of the recent studies also presents an interesting hypothesis – that *HNF1B* is involved in prostate cancer risk via modulating androgenic hormone effects and coordination with other genes (namely, *BAG1*, *DDR1*, *ERBB4*, *ESR1*, *HSPD1*, *IGFBP2*, *IGFBP5*, *NR4A1*, *PAWR*, *PIK3CG*, *RAP2A*, and *TPD52*) (Hu et al., 2013). According to this study, *HNF1B* was highly expressed in an androgenic hormone-dependent cell line,

pointing to its possible association with steroid hormone metabolism.

In prostatic tissue, the immunohistochemical expression of *HNF1B* was assessed in only one study in relation to tumour progression and aggressiveness, and the authors found that the expression of this marker was strongly associated with cancer cell proliferation (Debiais-Delpech et al., 2014). Nuclear *HNF1B* staining was significantly increased in the castration-resistant prostatic cancer and prostatic cancer with metastases groups when compared with clinically localized forms. In patients with clinically localized prostatic cancer, the expression of *HNF1B* was strongly associated with cancer cell proliferation.

### Kidney cancer

Tumours of the kidney should be of special interest when it comes to alterations of *HNF1B*, given the enormous significance of this transcription factor in the normal development of the renal tubular system. According to one study, there is a high frequency of chromosome 17q DNA alterations, leading to changes in *HNF1B* expression and therefore pointing to a possible role of *HNF1B* in papillary renal cell tumour (RCT) development (Szponar et al., 2011). These alterations combine specific duplication of the large chromosome 17q21.31-qter region, and more importantly, duplication/amplification of the chromosome 17q12 region, which among others contains the *HNF1B* gene. The authors studied the genetic changes and expression of *HNF1B* in papillary RCTs, metanephric adenoma (MA), mucinous tubular and spindle cell carcinoma (MTSCC) and their precursor lesions, as well as Wilms' tumour. The results acquired by RT-PCR showed that *HNF1B* is overexpressed in adult tumours of embryonal origin (papillary RCTs, Mas, and MTSCCs) and in their precursors – embryonic rests. In comparison, conventional RCCs, renal oncocytomas, chromophobe RCCs, and Wilms' tumours all showed only low levels of *HNF1B* expression, if any, which is particularly surprising given the above-mentioned results of other authors, who found conventional RCCs to show strong expression. The increased levels of expression in papillary RCTs were not only demonstrated via quantitative RT-PCR analysis, but also confirmed immunohistochemically. Immunohistochemical analysis showed strong positive nuclear staining in 56 % of papillary RCTs (38/67), and 100 % of metanephric adenomas (5/5) and mucinous tubular and spindle cell carcinomas (5/5). Strong nuclear positivity was also observed in all the precursor lesions (nephrogenic rests) associated with papillary RCTs and MTSCCs, suggesting that the overexpression of *HNF1B* in these lesions may lead to subsequent delayed tubular differentiation. This decreased cellular differentiation could represent the underlying factor in the development of the precursor lesions, which persist during life and lead to the development of papillary RCTs, MAs and MTSCCs. Wilms' tumour demonstrated negative

staining for HNF1B in the stromal and blastemal cells, but there was strong nuclear positivity in the differentiating tubules of surrounding nephrogenic rests. Renal oncocytomas showed isolated (1/18) positivity and chromophobe RCCs were negative for HNF1B staining, while conventional RCCs displayed only scattered nuclear positivity in 7 % (7/98) of cases. However, a different study focusing on renal cell carcinoma showed that the HNF1B mRNA expression correlated with malignant transformation and progression from normal renal tissue to primary tumour and to metastasis (Buchner et al., 2010). The same authors also performed immunohistochemistry (IHC) in order to localize HNF1B expression, which showed specific nuclear staining confined to the tumour cells of the primary tumours and metastases.

Contrary to the results published by Szponar et al. (2011), several studies identified HNF1B as not only a biomarker of OCCC, but as a broad marker of the clear cell phenotype in general. One such study further explored the relation between HNF1B and carcinomas of clear cell histology across both gynaecologic and renal carcinomas and found it to be strongly associated with both, similarly to their association with hypomethylation of the *HNF1B* promoter (Cuff et al., 2013). Furthermore, these authors also demonstrate a link between positive HNF1B immunostaining and an increased risk of clinically significant venous thrombosis (3-fold increase in the gynaecologic cohort and 2.3-fold increase in a combined gynaecologic and renal carcinoma cohort). HNF1B may therefore not be associated only with glycogen accumulation, but also with thrombosis.

### Liver cancer

The significance of HNF1B in liver tumours is largely unknown. However, recently, the expression of HNF1B in hepatocellular carcinoma (HCC) has been more closely examined, and so far the results suggest that the expression of HNF1B predicts disease recurrence and HCC-specific death after liver transplantation in patients with HCC (Shim et al., 2013). Several interesting conclusions are presented in another recent clinicopathological study that focused on evaluating HNF1B expression in different pathologic subtypes of primary liver cancer (hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma – ICC) (Yu et al., 2015). The immunohistochemically evaluated expression was associated with the pathological subtype of primary tumour (as HCC with strong nuclear expression displayed biliary phenotype) and was positively correlated with the expression of hepatocyte progenitor cell/biliary markers. Moreover, the results suggest that the HNF1B expression in HCC tumour tissue may be associated with the change of phenotype on recurrence. Out of the 183 cases of HCC examined in this study, 15 showed the ICC phenotype on recurrence, with all the cases showing strong immunohistochemical HNF1B positivity (with 3+ values in 80 % of them). Given these findings, HNF1B-positive

tumour cells may in fact represent bipotential cells that are capable of giving rise to both hepatocellular and biliary cell lineages, which is supported by the fact that in rare instances a combined hepatocellular-cholangiocarcinoma containing malignant cells of both of these origins may develop. Regarding prognostic factors, the authors found the expression of HNF1B to be an independent risk factor for both disease-free survival (DFS) and OS in HCC (but not in ICC), associated with poorer disease outcome.

### Conclusion

With the rise of genome-wide association studies and their use in human cancer genetics, it is increasingly apparent that a significant proportion of the identified risk alleles are located in the non-protein-coding parts of the human genome, and therefore probably represent regulatory elements acting through other regulatory protein transcripts. Given that most of the intron sequences remain unmapped, the number of emerging potentially significant variants is steadily increasing, although their interpretation and assessment of their meaning and biological effects are highly complicated and not always possible. According to the results of several recent studies referenced in this review, HNF1B may be one of these factors implicated in the pathogenesis of a number of solid tumours. Its role in the development of carcinomas with clear cell morphology (in both gynaecologic and non-gynaecologic setting) has already been established; however, as HNF1B also plays a distinctive role in the morphogenesis of other tissues, it is worth exploring whether differing expression and genetic changes of this factor could be implicated in the pathogenesis of other tumours of both the male and female genital tract, the urinary tract, and colorectal and pancreatic carcinoma. From the practical point of view, the immunohistochemical analysis of the HNF1B protein expression may be used in the differential diagnosis of several tumours. However, because of the paucity of knowledge regarding its expression in several tumour types, its use is currently limited mostly to tumours of the female genital tract and clear cell carcinomas of other origins. Despite its high sensitivity for clear cell carcinomas, the specificity is relatively low, and in routine practice a panel of other markers should be used, the correlation with tumour morphology being essential.

A comprehensive analysis of the morphological, genetic, immunohistochemical, and epigenetic changes of *HNF1B* is needed to better understand the role of HNF1B in the process of carcinogenesis, but such a complex analysis has yet to be undertaken.

### References

- Adalat, S., Woolf, A. S., Johnstone, K. A., Wirsing, A., Harries, L. W., Long, D. A., Hennekam, R. C., Ledermann, S. E., Rees, L., van't Hoff, W., Marks, S. D., Trompeter, R. S., Tullus, K., Winyard, P. J., Cansick, J., Mushtaq, I., Dhillon,



- H. K., Bingham, C., Edghill, E. L., Shroff, R., Stanescu, H., Ryffel, G. U., Ellard, S., Bockenhauer, D. (2009) HNF1B mutations associate with hypomagnesemia and renal magnesium wasting. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1123-1131.
- Alvelos, M. I., Rodrigues, M., Lobo, L., Medeira, A., Sousa, A. B., Simao, C., Lemos, M. C. (2015) A novel mutation of the HNF1B gene associated with hypoplastic glomerulocystic kidney disease and neonatal renal failure: a case report and mutation update. *Medicine (Baltimore)* **94**, e469.
- Barbacci, E., Chalkiadaki, A., Masdeu, C., Haumaitre, C., Lokmane, L., Lohr, C., Cloarec, S., Talianidis, I., Bellanne-Chantelot, C., Cereghini, S. (2004) HNF1 $\beta$ /TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 3139-3149.
- Bellanne-Chantelot, C., Chauveau, D., Gautier, J. F., Dubois-Laforgue, D., Clauin, S., Beaufile, S., Wilhelm, J. M., Boitard, C., Noel, L. H., Velho, G., Timsit, J. (2004) Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  mutations. *Ann. Intern. Med.* **140**, 510-517.
- Berndt, S. I., Sampson, J., Yeager, M., Jacobs, K. B., Wang, Z., Hutchinson, A., Chung, C., Orr, N., Wacholder, S., Chatterjee, N., Yu, K., Kraft, P., Feigelson, H. S., Thun, M. J., Diver, W. R., Albanes, D., Virtamo, J., Weinstein, S., Schumacher, F. R., Cancel-Tassin, G., Cussenot, O., Valeri, A., Andriole, G. L., Crawford, E. D., Haiman, C., Henderson, B., Kolonel, L., Le Marchand, L., Siddiq, A., Riboli, E., Travis, R. C., Kaaks, R., Isaacs, W., Isaacs, S., Wiley, K. E., Gronberg, H., Wiklund, F., Stattin, P., Xu, J., Zheng, S. L., Sun, J., Vatten, L. J., Hveem, K., Njolstad, I., Gerhard, D. S., Tucker, M., Hayes, R. B., Hoover, R. N., Fraumeni, J. F., Jr., Hunter, D. J., Thomas, G., Chanock, S. J. (2011) Large-scale fine mapping of the HNF1B locus and prostate cancer risk. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3322-3329.
- Bockenhauer, D., Jaureguierry, G. (2016) HNF1B-associated clinical phenotypes: the kidney and beyond. *Pediatr. Nephrol.* **31**, 707-714.
- Bubancova, I., Kovarikova, H., Laco, J., Ruzova, E., Dvorak, O., Palicka, V., Chmelarova, M. (2017) Next-generation sequencing approach in methylation analysis of HNF1B and GATA4 genes: searching for biomarkers in ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 474-485.
- Buchner, A., Castro, M., Hennig, A., Popp, T., Assmann, G., Stief, C. G., Zimmermann, W. (2010) Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology* **76**, 507.e506-511.
- Cereghini, S. (1996) Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* **10**, 267-282.
- Chornokur, G., Amankwah, E. K., Davis, S. N., Phelan, C. M., Park, J. Y., Pow-Sang, J., Kumar, N. B. (2013) Variation in HNF1B and obesity may influence prostate cancer risk in African American men: a pilot study. *Prostate Cancer* **2013**, 384594.
- Clissold, R. L., Hamilton, A. J., Hattersley, A. T., Ellard, S., Bingham, C. (2015) HNF1B-associated renal and extra-renal disease – an expanding clinical spectrum. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 102-112.
- Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G. E., Jakkula, L., Feiler, H. S., Ko, A. H., Olshen, A. B., Danenberg, K. L., Tempero, M. A., Spellman, P. T., Hanahan, D., Gray, J. W. (2011) Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat. Med.* **17**, 500-503.
- Cuff, J., Salari, K., Clarke, N., Esheba, G. E., Forster, A. D., Huang, S., West, R. B., Higgins, J. P., Longacre, T. A., Pollack, J. R. (2013) Integrative bioinformatics links HNF1B with clear cell carcinoma and tumor-associated thrombosis. *PLoS One* **8**, e74562.
- D'Angelo, A., Bluteau, O., Garcia-Gonzalez, M. A., Gresh, L., Doyen, A., Garbay, S., Robine, S., Pontoglio, M. (2010) Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  and  $\beta$  control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development* **137**, 1573-1582.
- De Vas, M. G., Kopp, J. L., Heliot, C., Sander, M., Cereghini, S., Haumaitre, C. (2015) Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3+ endocrine progenitors. *Development* **142**, 871-882.
- Debiais-Delpech, C., Godet, J., Pedretti, N., Bernard, F. X., Irani, J., Cathelineau, X., Cussenot, O., Fromont, G. (2014) Expression patterns of candidate susceptibility genes HNF1 $\beta$  and CtBP2 in prostate cancer: association with tumor progression. *Urol. Oncol.* **32**, 426-432.
- Edghill, E. L., Bingham, C., Ellard, S., Hattersley, A. T. (2006) Mutations in hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  and their related phenotypes. *J. Med. Genet.* **43**, 84-90.
- EI-Khairi, R., Vallier, L. (2016) The role of hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  in disease and development. *Diabetes Obes. Metab.* **18**(Suppl 1), 23-32.
- Elliott, K. S., Zeggini, E., McCarthy, M. I., Gudmundsson, J., Sulem, P., Stacey, S. N., Thorlacius, S., Amundadottir, L., Gronberg, H., Xu, J., Gaborieau, V., Eeles, R. A., Neal, D. E., Donovan, J. L., Hamdy, F. C., Muir, K., Hwang, S. J., Spitz, M. R., Zanke, B., Carvajal-Carmona, L., Brown, K. M., Australian Melanoma Family Study, I., Hayward, N. K., Macgregor, S., Tomlinson, I. P., Lemire, M., Amos, C. I., Murabito, J. M., Isaacs, W. B., Easton, D. F., Brennan, P., PanScan, C., Barkardottir, R. B., Gudbjartsson, D. F., Rafnar, T., Hunter, D. J., Chanock, S. J., Stefansson, K., Ioannidis, J. P. (2010) Evaluation of association of HNF1B variants with diverse cancers: collaborative analysis of data from 19 genome-wide association studies. *PLoS One* **5**, e10858.
- Fadare, O., Liang, S. X. (2012) Diagnostic utility of hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  immunoreactivity in endometrial carcinomas: lack of specificity for endometrial clear cell carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **20**, 580-587.
- Forbes, S. A., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., Ding, M., Bamford, S., Cole, C., Ward, S., Kok, C. Y., Jia, M., De, T., Teague, J. W., Stratton, M. R., McDermott, U., Campbell, P. J. (2015) COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* **43**, D805-811.
- Glinsky, G. V., Glinskii, A. B., Stephenson, A. J., Hoffman, R. M., Gerald, W. L. (2004) Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer. *J. Clin. Invest.* **113**, 913-923.

- Grisanzio, C., Werner, L., Takeda, D., Awoyemi, B. C., Pomerantz, M. M., Yamada, H., Sooriakumaran, P., Robinson, B. D., Leung, R., Schinzel, A. C., Mills, I., Ross-Adams, H., Neal, D. E., Kido, M., Yamamoto, T., Petrozziello, G., Stack, E. C., Lis, R., Kantoff, P. W., Loda, M., Sartor, O., Egawa, S., Tewari, A. K., Hahn, W. C., Freedman, M. L. (2012) Genetic and functional analyses implicate the NUDT11, HNF1B, and SLC22A3 genes in prostate cancer pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 11252-11257.
- Haldorsen, I. S., Vesterhus, M., Raeder, H., Jensen, D. K., Sovik, O., Molven, A., Njolstad, P. R. (2008) Lack of pancreatic body and tail in HNF1B mutation carriers. *Diabet. Med.* **25**, 782-787.
- Harries, L. W., Perry, J. R., McCullagh, P., Crundwell, M. (2010) Alterations in LMTK2, MSMB and HNF1B gene expression are associated with the development of prostate cancer. *BMC Cancer* **10**, 315.
- Hindorf, L. A., Gillanders, E. M., Manolio, T. A. (2011) Genetic architecture of cancer and other complex diseases: lessons learned and future directions. *Carcinogenesis* **32**, 945-954.
- Hu, Y. L., Zhong, D., Pang, F., Ning, Q. Y., Zhang, Y. Y., Li, G., Wu, J. Z., Mo, Z. N. (2013) HNF1B is involved in prostate cancer risk via modulating androgenic hormone effects and coordination with other genes. *Genet. Mol. Res.* **12**, 1327-1335.
- Janky, R., Binda, M. M., Allemeersch, J., Van den Broeck, A., Govaere, O., Swinnen, J. V., Roskams, T., Aerts, S., Topal, B. (2016) Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* **16**, 632.
- Kalloger, S. E., Kobel, M., Leung, S., Mehl, E., Gao, D., Marcon, K. M., Chow, C., Clarke, B. A., Huntsman, D. G., Gilks, C. B. (2011) Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Mod. Pathol.* **24**, 512-521.
- Kato, N., Sasou, S., Motoyama, T. (2006) Expression of hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod. Pathol.* **19**, 83-89.
- Kato, N., Motoyama, T. (2009) Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) in human urogenital organs: its expression and role in embryogenesis and tumorigenesis. *Histol. Histo-pathol.* **24**, 1479-1486.
- Kenny, S. L., McBride, H. A., Jamison, J., McCluggage, W. G. (2012) Mesonephric adenocarcinomas of the uterine cervix and corpus: HPV-negative neoplasms that are commonly PAX8, CA125, and HMGA2 positive and that may be immunoreactive with TTF1 and hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$ . *Am. J. Surg. Pathol.* **36**, 799-807.
- Kim, H. J., Bae, J. S., Lee, J., Chang, I. H., Kim, K. D., Shin, H. D., Han, J. H., Lee, S. Y., Kim, W., Myung, S. C. (2011) HNF1B polymorphism associated with development of prostate cancer in Korean patients. *Urology* **78**, 969.e961-966.
- Kondratyeva, L. G., Chernov, I. P., Zinovyeva, M. V., Kopantzev, E. P., Sverdlov, E. D. (2017) Expression of master regulatory genes of embryonic development in pancreatic tumors. *Dokl. Biochem. Biophys.* **475**, 250-252.
- Lebrun, G., Vasiliu, V., Bellanne-Chantelot, C., Bensman, A., Ulinski, T., Chretien, Y., Grunfeld, J. P. (2005) Cystic kidney disease, chromophobe renal cell carcinoma and TCF2 (HNF1 $\beta$ ) mutations. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **1**, 115-119.
- Li, J., Zhang, Y., Gao, Y., Cui, Y., Liu, H., Li, M., Tian, Y. (2014) Downregulation of HNF1 homeobox B is associated with drug resistance in ovarian cancer. *Oncol. Rep.* **32**, 979-988.
- Lokmane, L., Haumaitre, C., Garcia-Villalba, P., Anselme, I., Schneider-Maunoury, S., Cereghini, S. (2008) Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* **135**, 2777-2786.
- Mandato, V. D., Farnetti, E., Torricelli, F., Abrate, M., Casali, B., Ciarlina, G., Pirillo, D., Gelli, M. C., Nicoli, D., Grassi, M., GB, L. A. S., Palomba, S. (2015) HNF1B polymorphism influences the prognosis of endometrial cancer patients: a cohort study. *BMC Cancer* **15**, 229.
- Matsui, A., Fujimoto, J., Ishikawa, K., Ito, E., Goshima, N., Watanabe, S., Semba, K. (2016) Hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition. *FEBS Lett.* **590**, 1211-1221.
- Nemejcova, K., Cibula, D., Dundr, P. (2015a) Expression of HNF-1 $\beta$  in cervical carcinomas: an immunohistochemical study of 155 cases. *Diagn. Pathol.* **10**, 8.
- Nemejcova, K., Kenny, S. L., Laco, J., Skapa, P., Stanek, L., Zikan, M., Kleiblova, P., McCluggage, W. G., Dundr, P. (2015b) Atypical polypoid adenomyoma of the uterus: an immunohistochemical and molecular study of 21 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **39**, 1148-1155.
- Nemejcova, K., Ticha, I., Kleiblova, P., Bartu, M., Cibula, D., Jirsova, K., Dundr, P. (2016) Expression, epigenetic and genetic changes of HNF1B in endometrial lesions. *Pathol. Oncol. Res.* **22**, 523-530.
- Noto, H., Osame, K., Sasazuki, T., Noda, M. (2010) Substantially increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic evidence in Japan. *J. Diabetes Complications* **24**, 345-353.
- Painter, J. N., O'Mara, T. A., Batra, J., Cheng, T., Lose, F. A., Dennis, J., Michailidou, K., Tyrer, J. P., Ahmed, S., Ferguson, K., Healey, C. S., Kaufmann, S., Hillman, K. M., Walpole, C., Moya, L., Pollock, P., Jones, A., Howarth, K., Martin, L., Gorman, M., Hodgson, S., National Study of Endometrial Cancer Genetics, G., Consortium, C., De Polanco, M. M., Sans, M., Carracedo, A., Castellvi-Bel, S., Rojas-Martinez, A., Santos, E., Teixeira, M. R., Carvajal-Carmona, L., Shu, X. O., Long, J., Zheng, W., Xiang, Y. B., Australian National Endometrial Cancer Study, G., Montgomery, G. W., Webb, P. M., Scott, R. J., McEvoy, M., Attia, J., Holliday, E., Martin, N. G., Nyholt, D. R., Henders, A. K., Fasching, P. A., Hein, A., Beckmann, M. W., Renner, S. P., Dork, T., Hillemanns, P., Durst, M., Runnebaum, I., Lambrechts, D., Coenegrachts, L., Schrauwen, S., Amant, F., Winterhoff, B., Dowdy, S. C., Goode, E. L., Teoman, A., Salvesen, H. B., Trovik, J., Njolstad, T. S., Werner, H. M., Ashton, K., Proietto, T., Otton, G., Tzortzatos, G., Mints, M., Tham, E., Rendocas, Hall, P., Czene, K., Liu, J., Li, J., Hopper, J. L., Southey, M. C., Australian Ovarian Cancer, S., Ekici, A. B., Ruebner, M., Johnson, N., Peto, J., Burwinkel, B., Marme, F., Brenner, H., Dieffenbach, A. K., Meindl, A., Brauch, H., Network, G., Lindblom, A., Depreeuw, J., Moisse, M., Chang-Claude, J., Rudolph, A., Couch, F. J., Olson, J. E., Giles, G. G., Bruinsma, F., Cun-

- ningham, J. M., Fridley, B. L., Borresen-Dale, A. L., Kristensen, V. N., Cox, A., Swerdlow, A. J., Orr, N., Bolla, M. K., Wang, Q., Weber, R. P., Chen, Z., Shah, M., French, J. D., Pharoah, P. D., Dunning, A. M., Tomlinson, I., Easton, D. F., Edwards, S. L., Thompson, D. J., Spurdle, A. B. (2015) Fine-mapping of the HNF1B multicancer locus identifies candidate variants that mediate endometrial cancer risk. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1478-1492.
- Park, K. J., Kiyokawa, T., Soslow, R. A., Lamb, C. A., Oliva, E., Zivanovic, O., Juretzka, M. M., Pirog, E. C. (2011) Unusual endocervical adenocarcinomas: an immunohistochemical analysis with molecular detection of human papillomavirus. *Am. J. Surg. Pathol.* **35**, 633-646.
- Pinho, A. V., Rooman, I., Reichert, M., De Medts, N., Bouwens, L., Rustgi, A. K., Real, F. X. (2011) Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis. *Gut* **60**, 958-966.
- Poll, A. V., Pierreux, C. E., Lokmane, L., Haumaitre, C., Achouri, Y., Jacquemin, P., Rousseau, G. G., Cereghini, S., Lemaigre, F. P. (2006) A vHNF1/TCF2-HNF6 cascade regulates the transcription factor network that controls generation of pancreatic precursor cells. *Diabetes* **55**, 61-69.
- Pontoglio, M. (2000) Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**(Suppl 16), S140-143.
- Rebouissou, S., Vasiliu, V., Thomas, C., Bellanne-Chantelot, C., Bui, H., Chretien, Y., Timsit, J., Rosty, C., Laurent-Puig, P., Chauveau, D., Zucman-Rossi, J. (2005) Germline hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  and 1 $\beta$  mutations in renal cell carcinomas. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 603-614.
- Ross-Adams, H., Ball, S., Lawrenson, K., Halim, S., Russell, R., Wells, C., Strand, S. H., Orntoft, T. F., Larson, M., Armasu, S., Massie, C. E., Asim, M., Mortensen, M. M., Borre, M., Woodfine, K., Warren, A. Y., Lamb, A. D., Kay, J., Whitaker, H., Ramos-Montoya, A., Murrell, A., Sorensen, K. D., Fridley, B. L., Goode, E. L., Gayther, S. A., Masters, J., Neal, D. E., Mills, I. G. (2016) HNF1B variants associate with promoter methylation and regulate gene networks activated in prostate and ovarian cancer. *Oncotarget* **7**, 74734-74746.
- Setiawan, V. W., Haessler, J., Schumacher, F., Cote, M. L., Deelman, E., Fesinmeyer, M. D., Henderson, B. E., Jackson, R. D., Vockler, J. S., Wilkens, L. R., Yasmeen, S., Haiman, C. A., Peters, U., Le Marchand, L., Kooperberg, C. (2012) HNF1B and endometrial cancer risk: results from the PAGE study. *PLoS One* **7**, e30390.
- Shen, H., Fridley, B. L., Song, H., Lawrenson, K., Cunningham, J. M., Ramus, S. J., Cicek, M. S., Tyrer, J., Stram, D., Larson, M. C., Kobel, M., Consortium, P., Ziogas, A., Zheng, W., Yang, H. P., Wu, A. H., Wozniak, E. L., Woo, Y. L., Winterhoff, B., Wik, E., Whittemore, A. S., Wentzensen, N., Weber, R. P., Vitonis, A. F., Vincent, D., Vierkant, R. A., Vergote, I., Van Den Berg, D., Van Altena, A. M., Tworoger, S. S., Thompson, P. J., Tessier, D. C., Terry, K. L., Teo, S. H., Templeman, C., Stram, D. O., Southey, M. C., Sieh, W., Siddiqui, N., Shvetsov, Y. B., Shu, X. O., Shridhar, V., Wang-Gohrke, S., Severi, G., Schwaab, I., Salvesen, H. B., Rzepecka, I. K., Runnebaum, I. B., Rossing, M. A., Rodriguez-Rodriguez, L., Risch, H. A., Renner, S. P., Poole, E. M., Pike, M. C., Phelan, C. M., Pelttari, L. M., Pejovic, T., Paul, J., Orlov, I., Omar, S. Z., Olson, S. H., Odunsi, K., Nickels, S., Nevanlinna, H., Ness, R. B., Narod, S. A., Nakanishi, T., Moysich, K. B., Monteiro, A. N., Moes-Sosnowska, J., Modugno, F., Menon, U., McLaughlin, J. R., McGuire, V., Matsuo, K., Adenan, N. A., Massuger, L. F., Lurie, G., Lundvall, L., Lubinski, J., Lissowska, J., Levine, D. A., Leminen, A., Lee, A. W., Le, N. D., Lambrechts, S., Lambrechts, D., Kupryjanczyk, J., Krakstad, C., Konecny, G. E., Kjaer, S. K., Kiemeny, L. A., Kelemen, L. E., Keeney, G. L., Karlan, B. Y., Karevan, R., Kalli, K. R., Kajiyama, H., Ji, B. T., Jensen, A., Jakubowska, A., Iversen, E., Hosono, S., Hogdall, C. K., Hogdall, E., Hoatlin, M., Hillemanns, P., Heitz, F., Hein, R., Harter, P., Halle, M. K., Hall, P., Gronwald, J., Gore, M., Goodman, M. T., Giles, G. G., Gentry-Maharaj, A., Garcia-Closas, M., Flanagan, J. M., Fasching, P. A., Ekici, A. B., Edwards, R., Eccles, D., Easton, D. F., Durst, M., du Bois, A., Dork, T., Doherty, J. A., Despiere, E., Dansonka-Mieszkowska, A., Cybulski, C., Cramer, D. W., Cook, L. S., Chen, X., Charbonneau, B., Chang-Claude, J., Campbell, I., Butzow, R., Bunker, C. H., Brueggmann, D., Brown, R., Brooks-Wilson, A., Brinton, L. A., Bogdanova, N., Block, M. S., Benjamin, E., Beesley, J., Beckmann, M. W., Bandera, E. V., Baglietto, L., Bacot, F., Armasu, S. M., Antonenkova, N., Anton-Culver, H., Aben, K. K., Liang, D., Wu, X., Lu, K., Hildebrandt, M. A., Australian Ovarian Cancer Study, G., Australian Cancer, S., Schildkraut, J. M., Sellers, T. A., Huntsman, D., Berchuck, A., Chenevix-Trench, G., Gayther, S. A., Pharoah, P. D., Laird, P. W., Goode, E. L., Pearce, C. L. (2013) Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat. Commun.* **4**, 1628.
- Shigetomi, H., Sudo, T., Shimada, K., Uekuri, C., Tsuji, Y., Kanayama, S., Naruse, K., Yamada, Y., Konishi, N., Kobayashi, H. (2014) Inhibition of cell death and induction of G2 arrest accumulation in human ovarian clear cells by HNF-1 $\beta$  transcription factor: chemosensitivity is regulated by checkpoint kinase CHK1. *Int. J. Gynecol. Cancer* **24**, 838-843.
- Shim, J. H., Lee, H. C., Han, S., Kang, H. J., Yu, E., Lee, S. G. (2013) Hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  is a novel prognostic marker independent of the Milan criteria in transplantable hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis based on tissue microarrays. *Liver Transpl.* **19**, 336-345.
- Silva, T. D., Vidigal, V. M., Felipe, A. V., DE Lima, J. M., Neto, R. A., Saad, S. S., Forones, N. M. (2013) DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol. Lett.* **6**, 1687-1692.
- Spurdle, A. B., Thompson, D. J., Ahmed, S., Ferguson, K., Healey, C. S., O'Mara, T., Walker, L. C., Montgomery, S. B., Dermitzakis, E. T., Australian National Endometrial Cancer Study, G., Fahey, P., Montgomery, G. W., Webb, P. M., Fasching, P. A., Beckmann, M. W., Ekici, A. B., Hein, A., Lambrechts, D., Coenegrachts, L., Vergote, I., Amant, F., Salvesen, H. B., Trovik, J., Njolstad, T. S., Helland, H., Scott, R. J., Ashton, K., Proietto, T., Otton, G., National Study of Endometrial Cancer Genetics, G., Tomlinson, I., Gorman, M., Howarth, K., Hodgson, S., Garcia-Closas, M., Wentzensen, N., Yang, H., Chanock, S., Hall, P., Czene, K., Liu, J., Li, J., Shu, X. O., Zheng, W., Long, J., Xiang, Y.

- B., Shah, M., Morrison, J., Michailidou, K., Pharoah, P. D., Dunning, A. M., Easton, D. F. (2011) Genome-wide association study identifies a common variant associated with risk of endometrial cancer. *Nat. Genet.* **43**, 451-454.
- Sun, J., Zheng, S. L., Wiklund, F., Isaacs, S. D., Purcell, L. D., Gao, Z., Hsu, F. C., Kim, S. T., Liu, W., Zhu, Y., Stattin, P., Adami, H. O., Wiley, K. E., Dimitrov, L., Sun, J., Li, T., Turner, A. R., Adams, T. S., Adolfsson, J., Johansson, J. E., Lowey, J., Trock, B. J., Partin, A. W., Walsh, P. C., Trent, J. M., Duggan, D., Carpten, J., Chang, B. L., Gronberg, H., Isaacs, W. B., Xu, J. (2008) Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12. *Nat. Genet.* **40**, 1153-1155.
- Suzuki, E., Kajita, S., Takahashi, H., Matsumoto, T., Tsuruta, T., Saegusa, M. (2015) Transcriptional upregulation of HNF-1 $\beta$  by NF- $\kappa$ B in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression. *Lab. Invest.* **95**, 962-972.
- Szponar, A., Yüsenko, M. V., Kuiper, R., van Kessel, A. G., Kovacs, G. (2011) Genomic profiling of papillary renal cell tumors identifies small regions of DNA alterations: a possible role of HNF1B in tumor development. *Histopathology* **58**, 934-943.
- Terasawa, K., Toyota, M., Sagae, S., Ogi, K., Suzuki, H., Sonoda, T., Akino, K., Maruyama, R., Nishikawa, N., Imai, K., Shinomura, Y., Saito, T., Tokino, T. (2006) Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **94**, 914-921.
- Thomas, G., Jacobs, K. B., Yeager, M., Kraft, P., Wacholder, S., Orr, N., Yu, K., Chatterjee, N., Welch, R., Hutchinson, A., Crenshaw, A., Cancel-Tassin, G., Staats, B. J., Wang, Z., Gonzalez-Bosquet, J., Fang, J., Deng, X., Berndt, S. I., Calle, E. E., Feigelson, H. S., Thun, M. J., Rodriguez, C., Albanes, D., Virtamo, J., Weinstein, S., Schumacher, F. R., Giovannucci, E., Willett, W. C., Cussenot, O., Valeri, A., Andriole, G. L., Crawford, E. D., Tucker, M., Gerhard, D. S., Fraumeni, J. F., Jr., Hoover, R., Hayes, R. B., Hunter, D. J., Chanock, S. J. (2008) Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat. Genet.* **40**, 310-315.
- Tomassetti, A., De Santis, G., Castellano, G., Miotti, S., Mazzi, M., Tomasoni, D., Van Roy, F., Carcangiu, M. L., Canevari, S. (2008) Variant HNF1 modulates epithelial plasticity of normal and transformed ovary cells. *Neoplasia* **10**, 1481-1492.
- Tsuchiya, A., Sakamoto, M., Yasuda, J., Chuma, M., Ohta, T., Ohki, M., Yasugi, T., Taketani, Y., Hirohashi, S. (2003) Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **163**, 2503-2512.
- Verhave, J. C., Bech, A. P., Wetzels, J. F., Nijenhuis, T. (2016) Hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$ -associated kidney disease: more than renal cysts and diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 345-353.
- Yamamoto, S., Tsuda, H., Aida, S., Shimazaki, H., Tamai, S., Matsubara, O. (2007) Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  in ovarian and endometrial clear-cell adenocarcinomas and nonneoplastic endometrium. *Hum. Pathol.* **38**, 1074-1080.
- Ye, S., Yang, J., You, Y., Cao, D., Huang, H., Wu, M., Chen, J., Lang, J., Shen, K. (2016) Clinicopathologic significance of HNF-1 $\beta$ , AIRD1A, and PIK3CA expression in ovarian clear cell carcinoma: a tissue microarray study of 130 cases. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3003.
- Yu, D. D., Jing, Y. Y., Guo, S. W., Ye, F., Lu, W., Li, Q., Dong, Y. L., Gao, L., Yang, Y. T., Yang, Y., Wu, M. C., Wei, L. X. (2015) Overexpression of hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  predicting poor prognosis is associated with biliary phenotype in patients with hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep.* **5**, 13319.
- Zhao, Y., Liang, J., Qi, J. G., Yang, N., Wu, G., Lin, Y. L., Cao, J. Y., Wang, Q., Wang, Q. C. (2015) Meta-analysis of the association between the HNF1B rs4430796 (A>G) polymorphism and risk of prostate cancer based on case-control studies. *Genet. Mol. Res.* **14**, 7426-7435.



## Expression, Epigenetic, and Genetic Changes of HNF1B in Colorectal Lesions: an Analysis of 145 Cases

Michaela Bártů<sup>1</sup> · Jan Hojný<sup>1</sup> · Nikola Hájková<sup>1</sup> · Romana Michálková<sup>1</sup> · Eva Krkavcová<sup>1</sup> · Karol Simon<sup>2</sup> · Vladimír Frýba<sup>3</sup> · Ivana Stružinská<sup>1</sup> · Kristýna Němejcová<sup>1</sup> · Pavel Dundr<sup>1</sup>

Received: 10 January 2020 / Accepted: 21 May 2020  
© Arányi Lajos Foundation 2020

### Abstract

Hepatocyte nuclear factor 1 beta (HNF1B) is transcription factor which plays a crucial role in the regulation of the development of several organs, but also seems to be implicated in the development of certain tumours, especially the subset of clear cell carcinomas of the ovary and kidney. Depending on the type of the tumour, HNF1B may act as either a tumour suppressor or an oncogene, although the exact mechanism by which HNF1B participates in the process of cancerogenesis is unknown. Using immunohistochemical approach and methylation and mutation analysis, we have investigated the expression, epigenetic, and genetic changes of HNF1B on 40 cases of colorectal adenomas and 105 cases of colorectal carcinomas. The expression of HNF1B was correlated with the benign or malignant behaviour of the lesion, given that carcinomas showed significantly lower levels of expression compared to adenomas. In carcinomas, lower levels of HNF1B expression were associated with recurrence and shortened disease-free survival. The mutation analysis revealed three somatic mutations (two frameshift and one nonsense) in the carcinoma sample set. Promoter methylation was detected in three carcinomas. These results suggest that in colorectal cancer, HNF1B may play a part in the pathogenesis and act in a tumour suppressive fashion.

**Keywords** Colon · Adenoma · HNF-1-beta · Immunohistochemistry · Mutation analysis · Methylation

### Introduction

Hepatocyte nuclear factor 1 beta (HNF1B), also known as Transcription Factor-2 (TCF2), is a member of a family of transcription factors which, primarily, plays a crucial role in the regulation of the development of various tissues and organs. Most importantly, it is implicated in the ontogenesis and

differentiation of the liver (hence its name), but also the lung, gonads, biliary system, kidney and pancreas [1]. In adults, HNF1B expression is found especially in tubule-forming epithelial tissues such as kidney or pancreatic exocrine duct tubules [2], and also in other tissues such as colon, small intestine, stomach, testis, lung, liver, prostate etc. as described according to the complex RNA-Seq data [3]. As well as cell differentiation, HNF1B is also involved in the regulation of the expression of multiple genes implicated in cell cycle modulation, susceptibility to apoptosis, response to oxidative stress and glucose metabolism [4–6].

As HNF1B expression is found during the embryonic development of the kidneys, pancreas, liver, biliary tract, and reproductive tract, mutations of this gene are associated with various developmental disorders of these systems such as renal cysts and diabetes syndrome (RCAD), or maturity-onset diabetes of the young, type 5 (MODY5) [7, 8]. Furthermore, there is growing evidence that HNF1B may be involved in the tumorigenesis of several types of solid tumours, especially in the subset of clear cell carcinomas of the ovary and renal cell carcinomas of the kidney, but its role in the development of tumours of the gastrointestinal tract, liver, pancreas and prostate is also being discussed [6, 9–15].

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12253-020-00830-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pavel Dundr  
Pavel.Dundr@vfn.cz

<sup>1</sup> Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Studnickova 2, 12800 Prague 2, Czech Republic

<sup>2</sup> First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12800 Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> 1st Department of Surgery - Department of Abdominal, Thoracic Surgery and Traumatology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, 12808 Prague, Czech Republic

Despite the increasing interest and the number of studies dedicated to this topic, little is known about the possible HNF1B mutations which may be found in various tumours, although some single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been reported in the non-coding intronic sequences of the *HNF1B* loci associated with risk of kidney cancer [16] and endometrial cancer [17, 18]. Some ancestry-specific *HNF1B* variants associated with prostate cancer have also been reported [19, 20].

Interestingly, it seems that HNF1B may act as either a tumour suppressor or an oncogene depending on the type of tissue and tumour. How this influence is exerted specifically is not yet understood and there are studies which define HNF1B as a pro-differentiation factor with potent tumour-suppressive activity in healthy tissues [21], while other studies point to its role as an oncogene in tissues which have undergone malignant transformation, inducing a cancerous phenotype and activating the formation of invasive phenotypes through epithelial-mesenchymal transition [22]. The exact mechanism by which HNF1B participates in the process of cancerogenesis is unknown and probably differs in various types of tumours.

Given these diverse and often ambiguous results, our aim was to perform a comprehensive analysis of the expression and the epigenetic and genetic changes of HNF1B in benign and malignant lesions of the large intestine, as well as to further investigate the potential differential diagnostic and prognostic value of HNF1B.

## Material and Methods

### Samples

For the purposes of the study we used FFPE tissue blocks and, where available, the corresponding fresh-frozen tissue (FT) stored in the RNAlater stabilization solution (Qiagen) at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  according to the manufacturer's protocol

(Stabilization of RNA in Harvested Animal Tissues; Qiagen). The FFPE tissue blocks were obtained from the archives of our department and the corresponding FT samples were provided by the Bank of Biological Material (BBM) of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague.

A total of 145 FFPE tissue samples were used for the immunohistochemical analysis, including 105 cases of colorectal carcinoma and 40 cases of colonic adenoma. For the 105 cases in the colorectal carcinoma cohort, there were 78 cases with available corresponding FT sample pairs (tumour and non-tumour), which were subjected to DNA isolation for mutation and promoter methylation analysis. In the adenoma cohort, molecular analysis was performed for 34 samples with the use of DNA isolated from FFPE tissue blocks (no FT material was available for this cohort). The clinicopathological characteristics of the analysed samples are summarized in Tables 1 and 2.

Concerning the adenoma cohort, the samples consisted of a variety of adenoma types: tubular adenoma ( $n = 24$ ), tubulovillous adenoma ( $n = 9$ ), sessile serrated adenoma ( $n = 3$ ) and traditional serrated adenoma ( $n = 4$ ). For the carcinoma cohort, the characteristic of 'location' of the tumour was classified as either colon (including tumours found in the appendix, caecum and ascending colon to sigmoid colon) or rectum. The characteristic of 'grade' was divided into four groups (G1, G2, G3 and mucinous) with mucinous carcinomas being assigned a special category, given that the grade of these tumours depends on their microsatellite status, which was not available for all investigated cases (according to the 4th Edition of WHO Classification of Tumors of Digestive System) [23]. The characteristic of 'sidedness' was divided into right-sided (cecum, appendix, ascending colon, hepatic flexure and proximal two thirds of the transverse colon) and left-sided (distal third of the transverse colon, splenic flexure, descending colon, sigmoid colon and rectum) tumors.

The colorectal carcinoma samples were divided according to the TNM classification into four groups (pT1-pT4), while

**Table 1** Association of HNF1B expression and clinicopathological characteristics, based on 40 cases of colorectal adenoma

Characteristic	Group	N	H-score mean	H-score median	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	Expression of HNF1B (N)		
						group 1	group 2	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
Gender	Male	28	248.3	260	0.712	5	23	0.927
	Female	12	246.9	250		2	10	
Age (mean = 70, median = 73)	<70	14	233.2	243	0.140	2	12	0.694
	≥70	26	255.8	267		5	21	
Grade of dysplasia	High-grade	20	235.8	250	0.129	5	15	0.212
	Low-grade	20	260.1	257		2	18	

<sup>a</sup> – *p*-values are based on the Mann-Whitney U-test

<sup>b</sup> – *p*-values are based on the Pearson chi-square test (categorized expression)

**Table 2** Association of HNF1B expression and clinico-pathological characteristics, based on 105 cases of colorectal carcinoma

Characteristic	Group	N	H-score mean	H-score median	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	Expression of HNF1B (N)		
						group 1	group 2	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
Gender					0.267			0.162
	Male	61	191.7	210		29	32	
	Female	44	174.5	170		27	17	
Age (mean = 71, median = 71)					0.857			0.896
	<71	50	184.5	190		27	23	
	≥71	55	184.5	190		29	26	
Location					0.167			0.325
	Colon	93	188.6	195		48	45	
	Rectum	12	152.9	155		8	4	
Sidedness					0.451			0.937
	left-sided	54	190.6	190		29	25	
	right-sided	51	178	180		27	24	
Histological subtype					0.781			0.469
	non-mucinous	94	185.7	192.5		49	45	
	mucinous	11	175.0	174.1		7	4	
T stage					0.221			0.152
	T1	10	216.5	240		3	7	
	T2	30	165.8	165		19	11	
	T3	45	194.9	220		21	24	
	T4	20	173.3	180		13	7	
N stage					0.791			0.612
	N0	76	188.4	195		39	37	
	N1	17	177.9	180		9	8	
	N2	12	169.2	180		8	4	
M stage					0.844			0.772
	M0	89	183.8	190		48	41	
	M1	16	188.8	200		8	8	
Dukes staging					0.584			0.436
	A	10	216.5	240		3	7	
	B	50	183.3	178		28	22	
	C	29	173.3	180		17	12	
	D	16	188.8	200		8	8	
Stage TNM grouping					0.469			0.767
	I	34	175.3	170		20	14	
	II	34	201.8	220		16	18	
	III	21	168.3	180		12	9	
	IV	16	188.8	200		8	8	
Grade					0.097			0.161
	G1	26	204.4	225		11	15	
	G2	59	186.9	190		31	28	
	G3	8	113.1	110		7	1	
	mucinous	12	177.1	183		7	5	
LN positivity					0.498			0.502
	Positive	29	174.3	180		17	12	

Table 2 (continued)

Characteristic	Group	N	H-score mean	H-score median	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	Expression of HNF1B (N)		
						group 1	group 2	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
Lymphovascular invasion	Negative	76	190	200	0.742	39	37	0.392
	Yes	41	179.3	180		24	17	
	No	64	187.9	203		32	32	
Perineural invasion					0.363			0.576
	Yes	9	201.7	220		4	5	
	No	96	182.9	185		52	44	
MMR status*					0.318			0.341
	deficient	11	210.0	260		4	7	
	proficient	42	190.2	195		22	20	
Recurrence*					<b>0.048</b>			<b>0.019</b>
	Yes	16	147.8	153		13	3	
	No	87	189.5	205		43	44	
MSI*					0.274			0.734
	MSS	83	180.3	190		45	38	
	MSI-H	20	200.3	205		10	10	

\*- data are not available for all cases

<sup>a</sup>- *p*-values are based on the Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis H-test

<sup>b</sup>- *p*-values are based on the Pearson chi-square test (categorized expression)

the adenoma samples were divided according to the grade of the epithelial dysplasia (low grade vs. high grade). For the purposes of the study a total of 145 lesions of the large intestine were selected, including 105 cases of carcinoma of the large intestine (pT1 = 10 cases, pT2 = 30 cases, pT3 = 45 cases, pT4 = 20 cases) and 40 cases of adenoma (LG dysplasia = 20 cases, HG dysplasia = 20 cases).

All the included cases underwent a histologic review of the hematoxylin and eosin-stained slides. During this review the eligible and appropriate areas of the tumour were identified and marked in order to provide tissue cores for the construction of the TMAs. Two tissue cores (each 2.0 mm in diameter) were drilled from the donor block from each case using the tissue microarray instrument TMA Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary).

### Ethical Approval

The study has been approved by the Ethics Committee of General University Hospital in Prague in compliance with the Helsinki Declaration (ethical approval number 41/16 Grant VES 2017 AZV VFN). The Ethics Committee waived the requirement for informed consent, because according to the Czech Law (Act. no. 373/11, and its amendment Act no.

202/17) it is not necessary to obtain informed consent in fully anonymized studies.

### DNA Isolation and Quality Control

Prior to the isolation of the FT samples, the tissues were thawed, and 10–30 mg were homogenized using MagNA Lyser Green Beads tubes in a MagNA Lyser Instrument (Roche) in the presence of 600 µl of RLT Plus buffer (Qiagen) with 6 µl of 14.3 M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). The total DNAs and RNAs were isolated according to the Simultaneous Purification of Genomic DNA and Total RNA from Animal Tissues protocol by using an AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen). The isolated DNA samples were quantified by NanoDrop 2000 (Thermo Fisher).

DNA from the tissue sections from the archived FFPE tissue blocks was isolated using an automatic isolator MagCore® nucleic Acid Extractor, utilizing the MagCore Genomic DNA FFPE One-step kit, Ref MGF-03 (RBC Bioscience). The isolated DNA was quantified by Qubit fluorimeter (Thermo Fisher) and underwent a quality control test of amplification efficacy by qPCR (5 ng DNA of sample was amplified using 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix NO ROX; Solis Biodyne). Only the samples which passed the



quality criteria ( $C_p < 35$  for a 180 bp product amplification) were used for subsequent analysis.

### Immunohistochemical Analysis

The immunohistochemical (IHC) analysis was performed on all samples using the standard 4  $\mu\text{m}$  thick sections of FFPE tissue and the automated staining instrument Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland) with a rabbit antibody against the HNF1B protein (polyclonal, dilution 1:500, product no. HPA002083, Sigma-Aldrich, Prestige Antibodies, St. Louis, United States). The heat induced epitope retrieval with a citrate buffer (pH 6.0) was used for pre-treatment. The detection of the primary antibody was visualized using the OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana, Roche). Only nuclear staining was regarded as positive and the nuclear expression of HNF1B was double-blindly evaluated by two independent pathologists.

The immunohistochemical results were assessed according to the overall percentage of positive cells (0–100%) and then also semi-quantitatively, using the H-score method previously described by others [24]. This method is based on the assessment of the percentage of positive cells based on the level of staining intensity (1+ for weak intensity, 2+ for moderate and 3+ for strong intensity). The final H-score for each case is then calculated by adding the multiplication of the different staining intensities according to the following formula:  $[1 \times (\% \text{ of cells } 1+) + 2 \times (\% \text{ of cells } 2+) + 3 \times (\% \text{ of cells } 3+)]$ , resulting in the H-score value of 0–300.

Prior to the construction of TMAs and the use of the staining instruments, we performed a validation of the staining method, for which 10 cases of colorectal carcinoma, 10 cases of normal mucosa of the large intestine, and 10 cases of adenoma were randomly selected. From these we obtained whole-tissue sections which were stained with the antibody against HNF1B in order to assess the quality of the staining and heterogeneity of HNF1B expression. Although the intensity levels of the staining differed among the different lesions, the staining was homogenous throughout the examined tissues and therefore the decision was made to test all the carcinoma samples ( $n = 105$ ) using the constructed TMAs. Even though the expression pattern of adenomas was also homogenous, the amount of tumour tissue available from each case tended to be rather low and that is why only the larger adenomas, which allowed for the extraction of 2 tissue cores, were selected for the construction of TMA ( $n = 30$ ), while the remaining samples ( $n = 10$ ) were processed as whole-tissue sections.

Positive and negative internal controls were evaluated for each of the IHC stained slides. The staining of normal, non-neoplastic intestinal epithelial cells served as a positive control, while the lack of staining of other structures (such as the connective tissue, smooth muscle and adipose tissue) served as a negative control.

### Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the software Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, OK). The nonparametric ANOVA approach was used in order to analyse the association between HNF1B expression (H-score as a continuous dependent variable) and clinicopathological characteristics (categorical variables). Depending on the number of categories either the Mann-Whitney U-test (two categories) or the Kruskal-Wallis H-test (three and more categories) was used. For the evaluation of the effect of independent clinicopathological characteristics on the categorized H-score, the Pearson chi-square test was used. Survival analyses were plotted using the Kaplan-Meier method and analysed using the log-rank test. The evaluated outcomes included DFS (death from colorectal carcinoma was considered as a failure), LFS (counted as the period from the date of the primary diagnosis to the date of diagnosis of the first local recurrence) and MFS (counted as the period from the date of the primary diagnosis to the date of the diagnosis of the first distant metastasis). The date of primary diagnosis is the date of the confirmation of the biopsy diagnosis. For the purposes of chi-squared tests and survival analyses, the H-score was categorized into two groups (group 1: H-score 0–200; group 2: H-score 201–300). All tests were two-sided and a  $P$  value of less than 0.05 was considered as significant.

### Genetic and Epigenetic Analysis

Molecular analyses included DNA mutation analysis of the coding parts of the *HNF1B* exons with adjacent intronic sequences ( $\pm 15$  bp) and epigenetic analysis of CpG methylation in the region of the *HNF1B* promoter.

The *HNF1B* mutation analysis was performed using two different approaches, depending on the origin of the analysed material. High-quality FT DNA samples (78 tumour and 12 paired non-tumour tissues) were analysed by in-house 2-step polymerase chain reaction (PCR) amplicon next-generation sequencing (NGS), while the FFPE DNA samples (20 tumour samples) were analysed by a capture-based panel NGS, which is more suitable for FFPE samples and included all the coding parts of the *HNF1B* gene.

### Amplicon NGS Preparation and Sequencing

For the in-house 2-step PCR amplicon approach, 15 primer pairs with universal adaptor sequences were designed (list of primers is provided in Online Resource 1) to fit the specific *HNF1B* gene regions in the first PCR step, including deep intronic regions containing the rs7527210 and rs4430796 variant sites. In the second PCR step, a universal primer pair containing Illumina sequencing adaptor sequences was used (Online Resource 1). The first PCR step covering the HNF1B

target regions was performed in two separate multiplex reactions. Each reaction included a different primer pair set (Online Resource 1) in order to eliminate unwanted primer interactions. Both PCR reactions were amplified using the FastStart High Fidelity PCR System (Roche) according to the recommended standard PCR procedure (FastStart High Fidelity PCR System; Roche) in 20  $\mu$ l reactions according to the following PCR protocol: 2 min – 95 °C; 10 cycles of 15 s – 95 °C, 20 s – 62 °C and 30 s – 72 °C (all steps with ramping temperature 2 °C/s) and then 20 cycles of 15 s – 95 °C, 20 s – 62 °C and 30 s – 72 °C (standard ramping temperature 4 °C/s). After the first PCR step, 10  $\mu$ l of both first PCR reactions were equimolarly mixed and purified by the AMPure XP system (0,8x; Beckmann Coulter). The purified PCR product was amplified by 10 cycles of the second PCR step using the same protocol, with a standard ramping rate and different primers (the universal primer pair with Illumina adaptor sequences was used).

After the second PCR step, the concentrations of the PCR products were measured using the Qubit fluorimeter (Thermo Fisher) and then equimolarly mixed into one sequencing library. Once the sequencing library was prepared, it was purified using the AMPure XP system (0,8x; Beckmann Coulter), measured for concentration (Qubit) and for fragment length using High Sensitivity NGS Fragment Analysis kit on the Fragment Analyzer (AATI). The amplicon library was then sequenced together with different (capture) libraries in order to increase sequencing heterogeneity. The sequencing was performed either using 50 samples, which were sequenced in one amplicon library by the MiSeq 300 cycles v2 kit or using 90 samples by the NextSeq 300 cycles mid output kit v2.5. The amplicon sequencing approach showed low coverage of 20 bp on the 5' end of exon 4 in all of the tested samples, and therefore this part was additionally sequenced by the Sanger sequencing method as described elsewhere [25] with the use of a specific primer pair (Online Resource 1).

#### Capture-Based NGS Preparation and Sequencing

The DNA from the FFPE samples was prepared using the SeqCap custom hybridization probes (257kbp panel of gene targets, NimbleGen, Roche; the list provided in Online Resource 2) and sequenced as described in Ticha et al., 2019 [26]. The libraries were sequenced by the NextSeq 500 instrument using the NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Cycles).

#### Biostatistical Analysis of NGS Data

Both the amplicon and panel sequencing raw data were demultiplexed and converted into the .fastq format and analysed by the same pipeline using the NextGENe software (Softgenetics) as described elsewhere [27]. For the reads

mapping and analysis, the GRCh37 genome and NM\_000458.2 reference transcript was used. Only the samples with minimal coverage >200x and variants with variant allele frequency (VAF) > 10% were further evaluated. The identified variants were manually inspected using IGV (Broad Institute) and prioritized according to the mutation impact [27]. Only the mutations of class 3, 4 or 5 were reported.

#### Microsatellite Instability

Analysis of microsatellite instability (MSI) was performed with the following set of five quasimonomorphic mononucleotide microsatellite markers: BAT-26, BAT-25, NR-21, NR-22, NR-24 [28]. Fragmentation analysis was performed using ABI 3500 (ThermoFisher). The MSI-high or MSI-low phenotypes were defined as the presence of two or more, or a single unstable locus, respectively. MSI stable tumors (MSS) show no instability.

#### HNF1B Promoter Methylation

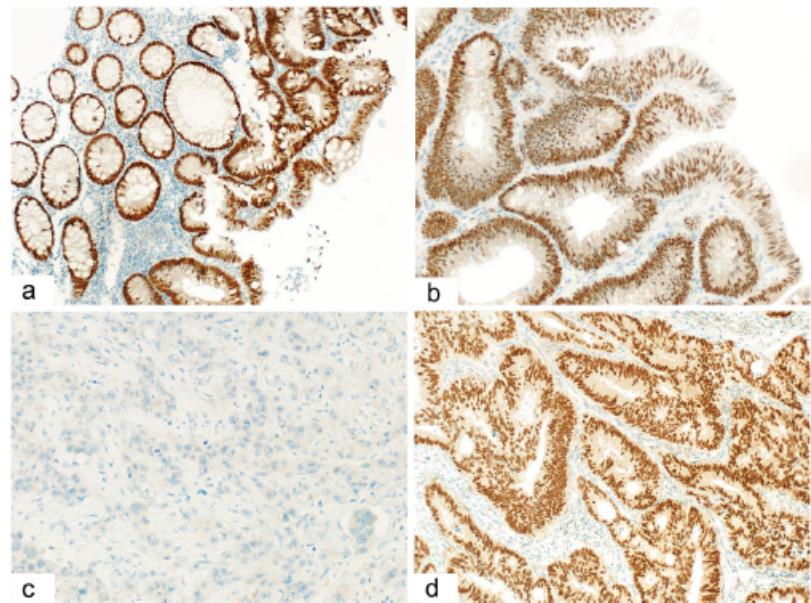
Bisulfite conversion of DNA was performed using the EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The primers (Online Resource 1) used for PCR amplification of both the methylated and unmethylated alleles were designed using the software Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). The amplified promoter region of *HNF1B* covers 15 CpG islands (as illustrated in Online Resource 3, part a) and includes a CpG island (chr17:36105517–36,105,518, GRCh37) whose methylation is associated with a decreased *HNF1B* expression [29]. In our settings we were able to detect at least 5% of methylated DNA by High Resolution Melting (HRM) Analysis of the amplified PCR products. Each run included the converted DNA samples and a series of 100%, 20%, 10%, 5 and 0% universally methylated DNA controls mixed with non-methylated DNA (Human HCT116 DKO Non-Methylated DNA and Human HCT116 DKO Methylated DNA; Zymo Research). The melting curves of the analysed samples were compared with the melting curves of the control mixes (Online Resource 3) [30].

## Results

### Immunohistochemical Findings

Overall, virtually all of the colorectal carcinoma and adenoma samples showed some degree of homogenous, constant nuclear expression of *HNF1B*. The results of *HNF1B* expression are summarized in Tables 1 and 2. Figure 1 (a, c, d) shows representative examples of *HNF1B* expression in colorectal

**Fig. 1** Immunohistochemical staining of the HNF1B expression in colorectal lesions **a** Strong nuclear expression in the normal epithelial lining of non-neoplastic crypts and equally strong nuclear expression in the adenoma with low grade epithelial dysplasia on the right (100x). **b** Low grade adenoma with superficial areas of high-grade dysplasia, note the decrease of HNF1B expression in the high-grade portions of the epithelium (200x). **c** Complete lack of nuclear expression in colorectal carcinoma (200x). **d** Strong, diffuse nuclear expression in colorectal carcinoma (100x)



carcinomas and adenomas, which was correlated with the benign or malignant behaviour of the lesion. The group of carcinomas showed significantly lower levels of expression compared to adenomas ( $p < 0.001$ ) (Table 3 and Fig. 2). When evaluating the association between HNF1B expression and clinicopathological characteristics (Table 2), a lower HNF1B expression was associated with recurrence ( $p = 0.043$ ) (Fig. 3). None of the other parameters (gender, age, anatomical location, sidedness, T / N / M stage of the tumour, Dukes stage, grade, lymph node positivity, lymphovascular invasion, perineural invasion, and MMR status evaluated by immunohistochemistry where applicable) showed any association on a significant level.

The group of adenomas showed not only significantly higher levels of expression ( $p < 0.001$ ), but also an overall higher intensity of the staining when compared to carcinomas ( $p < 0.001$ ; Table 3). Although there were no statistically significant differences in the H-score based on the grade of epithelial dysplasia [high-grade (HG) dysplasia H-score: 235.8/

250 (mean / median) and low-grade (LG) dysplasia H-score: 260.1/257 (mean / median)], in cases of adenomas with predominantly LG dysplasia and only short sections of HG dysplasia there were some interesting changes in the staining pattern. While the epithelial cells with LG dysplasia showed strong, diffuse staining, the superficial portions of the adenoma with HG dysplasia showed a gradual decrease in the intensity of the staining, although the presence of staining positivity was preserved (Fig. 1b). None of the evaluated clinicopathological characteristics in the group of adenomas (gender, age, grade of dysplasia) yielded statistically significant results when assessing the association of these with HNF1B expression (Table 1).

Survival analyses for the three available outcomes [disease-free survival (DFS), local recurrence-free survival (LFS), and distant metastasis-free survival (MFS)] were performed and included 98 carcinoma cases with available follow-up from the sample set of 105 carcinomas. They showed a statistically significant association between HNF1B expression

**Table 3** Association of HNF1B expression and the type of diagnosis, based on 145 cases of colorectal lesions

Characteristic	Group	N	H-score mean	H-score median	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	Expression of HNF1B (N)		
						group 1	group 2	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
Type of lesion					< 0.001			< 0.001
	Adenoma	40	247.9	253		7	33	
	Carcinoma	105	184.5	190		56	49	

<sup>a</sup> – *p*-values are based on the Mann-Whitney U-test

<sup>b</sup> – *p*-values are based on the Pearson chi-square test (categorized expression)

(categorized into two groups as described above) and DFS ( $p = 0.014$ ), where lower levels of HNF1B expression were associated with adverse DFS (Fig. 4). The other monitored outcomes did not reach significant values (LFS  $p = 0.101$ , MFS  $p = 0.057$ ), although there is a trend suggesting an association between lower HNF1B expression and shorter LFS and MFS (Fig. 4).

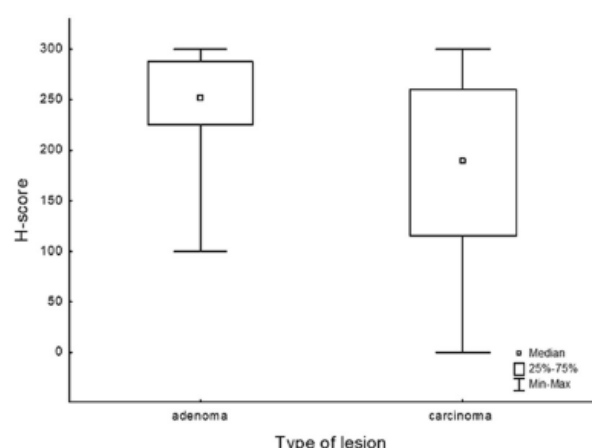
## Genetic and Epigenetic Changes of the HNF1B Gene

### Mutation Analysis

Mutation analysis was successfully performed on 84 samples (73 samples of tumour tissue and 11 samples of corresponding healthy tissue) from the total of 90 samples with available fresh-frozen tissue (FT) material (78 tumour and 12 non-tumour) in the sample set of colorectal carcinomas. In the sample set of adenomas, the analysis was successfully performed on 20 samples (from the total of 34 samples, for which only formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material was available).

Among the 73 colorectal carcinomas we found three somatic *HNF1B* mutations, including two frameshift and one nonsense: c.149delC p.P50LfsTer75 (variant allele frequency (VAF) 38.45%) (hereinafter referred to as Sample A, H-score: 210); c.1006delC, p.H336TfsTer40 (VAF 34.88%) (hereinafter referred to as Sample B, H-score: 240) and c.554C>T, p.Q182X (VAF 26.79%) (hereinafter referred to as Sample C, H-score: 80). Other clinically relevant, either somatic or hereditary mutations were not present. No mutations were revealed among the 11 adenomas.

Given that the effect of HNF1B single nucleotide polymorphisms is also discussed in the literature with often equivocal yet suggestive results, we also evaluated the impact of two of



**Fig. 2** Association of H-score of HNF1B and type of the lesion. Analysis based on 145 cases (adenoma:  $N = 40$ , carcinoma:  $N = 105$ ). Mann-Whitney U-test:  $Z = 4.069$ ,  $p < 0.001$

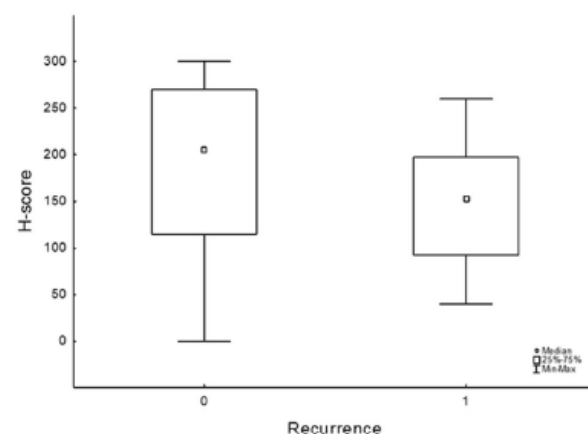
the most commonly reported SNPs (rs4430796 and rs7527210) on colorectal carcinoma survival. Considering rs4430796 SNP, a significantly better DFS was observed in patients with the AA genotype when compared to GA and GG ( $p = 0.035$ ; Fig. 5). No significant effect was detected in the case of rs7527210 ( $p = 0.942$ , data not shown).

### Microsatellite Instability

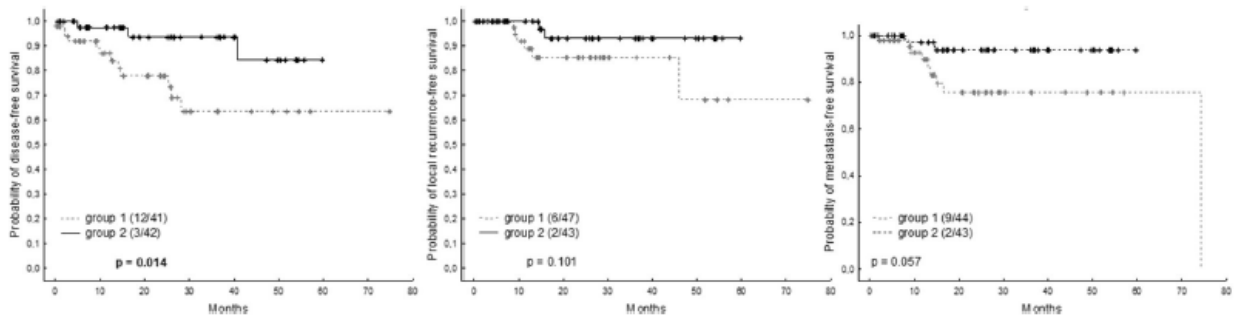
The MSI analysis was successfully performed on 103/105 carcinoma samples (the remaining 2 samples did not have enough tumour tissue left for molecular analysis). The results showed that 81/103 tumours were MSS, 20/103 were MSI-H and 2/103 were MSI-L. The two MSI-L tumour samples were additionally evaluated using immunohistochemical analysis with antibodies against mismatch-repair proteins (MLH1, PSM2, MSH2, MSH6), which showed preserved expression. Therefore, for the purposes of statistical analyses, those 2 samples were added into the MSS group. Statistical analysis did not show any significant association between HNF1B expression and the two groups (MSI-H versus MSS) of carcinomas (Table 2).

### Epigenetic Analysis

Promoter methylation analysis was successfully carried out in 93 (72 carcinomas and 21 adenomas) out of the 99 samples which had undergone the bisulphite DNA conversion. Promoter methylation was detected in 3/72 (4.2%) adenocarcinomas: in two cases a low degree of methylation was detected (5–10%, H-score of the corresponding tumours was 30 and 95), and in one case it was a moderate degree of methylation (approx. 25%, H-score = 295). Non-tumour tissue was available for two of those tumour samples, and no methylation



**Fig. 3** Association of H-score of HNF1B and disease recurrence. Analyses based on 105 cases of colorectal carcinoma. 0 = no recurrence, 1 = recurrence occurs. Mann-Whitney U-test:  $Z = 2.021$ ,  $p = 0.043$



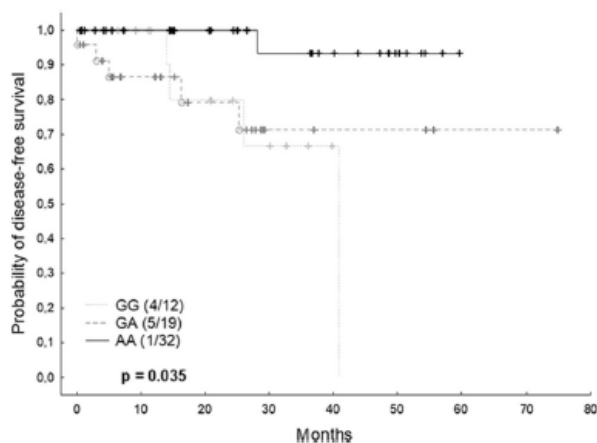
**Fig. 4** Correlation of HNF1B protein expression with prognosis. The probability of disease-free survival (a) local recurrence-free survival (b) and metastasis-free survival (c) in relation to category of H-score of HNF1B in 98 cases of colorectal carcinoma. The survival curves are

estimated using the Kaplan-Meier method, *p* values are estimated using the log-rank test. The number of complete/censored data are shown in parentheses

was detected in either case. In the cohort of adenomas, methylation was observed in 1/21 adenomas (4.7%). The non-tumour tissue was not available in this case. Of the 87 isolated non-tumour tissue samples the analysis was successfully performed in 61 cases, all of which were non-methylated.

**Discussion**

HNF1B belongs to one of the four major hepatocyte nuclear factor families, which include HNF1 (HNF1 $\alpha$  and HNF1 $\beta$ ), HNF3 (or FOXA, made up of FOXA1, FOXA2 and FOXA3), HNF4 (HNF4 $\alpha$  and HNF4 $\gamma$ ) and HNF6 (or ONECUT, OC, made up of OC1, OC2 and OC3) [31]. Depending on the circumstances, it functions as a bookmarking transcription factor which regulates gene expression by maintaining active transcription or counteracting the epigenetic silencing effect of chromatin condensation [1].



**Fig. 5** Correlation of rs4430796 genotype with prognosis. The probability of disease-free survival in relation to rs4430796 SNP genotypes, based on 73 cases of colorectal carcinoma. The survival curve is estimated using the Kaplan-Meier method, the *p* value is estimated using the log-rank test. The number of complete/censored data are shown in parentheses

The key influence of this transcription factor is two-fold. Firstly, HNF1B is involved especially in the development of the kidneys, biliary system, pancreas and gastrointestinal tract [32, 33]. Secondly, its role in the development and progression of cancer (and potentially also chemoresistance in certain tumour types) has been discussed in recent years, with research focusing especially on tumours with clear cell phenotype, given that >90% of these tumours show HNF1B positivity [34].

We have performed a comprehensive, multi-level analysis of the *HNF1B* gene in the setting of benign and malignant lesions of the large intestine. The results of mutation analysis revealed the presence of 3/73 (4.1%) inactivating somatic mutations (VAF around 30% for all three cases) in the colorectal carcinoma cohort, two of which were frameshift (sample A and B) with retained immunohistochemical expression of HNF1B (H-score 210 and 240, respectively). The remaining was a nonsense mutation c.554C > T, p.Q182X (sample C), with a retained but significantly decreased expression of HNF1B (H-score 80). The retained expression could be explained by the incomplete inactivation of one or both alleles or by a possible tumor heterogeneity. There were no mutations detected in the cohort of adenomas. There is very little information in the literature which deals with the presence of either germline or somatic *HNF1B* mutations in malignant tumours, and no information whatsoever regarding specifically colorectal carcinomas. There have been some rare (mostly case report) instances of germline *HNF1B* mutations associated with chromophobe renal cell carcinoma (RCC) [16, 35], confirming that HNF1B acts as a tumour suppressor during carcinogenesis of chromophobe RCC. Similar results were reported for Wilms tumour (WT), which showed decreased HNF1B expression in Wilms' tumour tissue when compared to the adjacent non-cancerous tissue [1]. Reports of somatic mutations associated with HNF1B-mediated carcinogenesis are equally sparse, and based on an extensive search of the literature it is in fact only our recent study, which described somatic mutations of the *HNF1B* gene in solid tumours of the

female genital tract [36]. In this study, the analysis of genetic variants using HRM (High Resolution Melting) analysis and Sanger direct sequencing of the whole coding sequences of *HNF1B* revealed 1 clinically relevant somatic mutation among 30 endometrial endometrioid carcinomas and one missense variant of unknown significance among 12 ovarian clear cell carcinomas (OCCC) [36].

The prognosis of certain malignant neoplasms may also be influenced by polymorphisms in the non-coding intronic sequences of *HNF1B*. The relationship between *HNF1B* SNPs has already been studied especially for endometrial cancer, ovarian clear cell carcinoma and prostate cancer, but it was yet to be investigated for colorectal cancer [37]. Based on the results of genome-wide association studies, the most commonly implicated SNPs are rs447096 (located in the intron 2 (i2), also known as rs17626333 or rs5876954), rs7527210 (located in i2, also known as rs3786124 or rs60456671) and several other SNPs studied for their association with prostate cancer (rs11649743, rs7501939, rs7405696, rs1016990, rs3094509 and rs4794758) [19, 38, 39]. However, although the number of studies focusing on the association between these intron-situated *HNF1B* SNPs and the risk of certain cancers is steadily increasing, their results are often conflicting and even their clinical role and significance remains unclear.

In the current study, we examined the effect of two selected SNPs (rs4430796 and rs7527210) on colorectal carcinoma survival and found that for SNP rs4430796 there were statistically significant differences in the estimated disease-free survival based on three rs4430796 genotypes. Those patients with the AA genotype showed a significantly better DFS ( $p=0.035$ ) than patients with GA and GG genotypes, with the GG genotype showing the worst prognosis. This result is in accordance with studies performed on other cohorts, especially endometrial cancer and ovarian cancer. For endometrial cancer, it has been reported that patients with the GG genotype also demonstrated the worst overall survival (OS) [40]. This finding might be associated with the reported effect of *HNF1B* overexpression on the chemoresistant phenotype of OCCC, given the observed relationship between the GG genotype and decreased OS. The G allele may be implicated in reducing chemosensitivity to cisplatin- or paclitaxel-mediated cytotoxicity, which is particularly interesting in the context of colorectal cancer, given that the backbone of adjuvant therapy for advanced disease lies in fluoropyrimidine- and oxaliplatin-based regimes [41]. In our cohort no significant effect was detected in the case of the SNP rs7527210 ( $p=0.942$ , data not shown), which is also mentioned in literature as an ovarian cancer risk- and prostate cancer risk-associated SNP [21].

Epigenetic changes of the *HNF1B* gene, especially epigenetic silencing, have also been reported in several types of human cancers. In general, aberrant methylation of promoter regions of certain tumour suppressor genes is one of the key events in tumour growth initiation and progression.

Hypermethylation of the promoter region of *HNF1B* has even been suggested as a possible non-invasive epigenetic marker of colorectal carcinoma [42]. According to this study, *HNF1B* was one of the five genes with the highest average percentages of promoter hypermethylation, along with *RUNX3*, *PCDH10*, *SFRP5* and *IGF2*. There are other studies which also mention epigenetic inactivation of *HNF1B* in colorectal cancer cell lines, suggesting its involvement in cancerogenesis [43].

Partial methylation was observed in 3/72 (4.1%) analysed carcinomas and 1/21 (4.7%) adenomas in our study. This single methylated adenoma was a high grade tubulovillous adenoma which despite the methylation showed a strong, diffuse immunohistochemical positivity of *HNF1B*. Protein expression of *HNF1B* was also retained in partially methylated carcinomas. Methylation of the promoter did not correlate with *HNF1B* protein expression, which could be a result of an incomplete inactivation of the *HNF1B* gene. In our sample set of colorectal lesions, the *HNF1B*-promoter methylation was therefore not a frequent phenomenon, which is in accordance with the data gained from The Cancer Genome Atlas (TCGA), which shows very low degrees of methylation (Online Resource 4) in their colorectal carcinoma cohort. On the other hand, these results are in stark contrast with the aforementioned previous findings [42, 43]. However, in the study published by Silva et al. the authors tested only 10 tumours in total and used a different methodical approach from ours (Methyl-Profiler™ DNA Methylation PCR Array System), which may provide an explanation for the significantly different results. The study conducted by Terasawa et al. only examined *HNF1B* methylation in exon 1, which might have produced different results from ours since in our study we tested promoter methylation upstream of exon 1.

To our knowledge, there is very little information on the role *HNF1B* may play in the development of lesions of the large intestine, specifically colorectal cancer and colonic adenomas. As has already been mentioned, *HNF1B* is involved in the differentiation of visceral endoderm and therefore in the development of colonic epithelial cells, especially their terminal differentiation and cell fate commitment [44]. In fact *HNF1B* is reported to be abundant in normal intestinal epithelium, where it cooperates with *CDX2* in order to direct key transcriptional programs involved in the dynamic status of intestinal epithelium [45]. Studies on a mouse model showed that while *HNF1A* deficiency gave rise to mice which were born normally but suffered from functional defects, germline *HNF1B* embryonic deficiency was found to be lethal, as it leads to a defective differentiation of extraembryonic visceral endoderm [46].

In keeping with these findings, our results did indeed show that there is a strong, diffuse nuclear positivity of *HNF1B* in the normal colonic mucosa, and this trend is also observed in the staining of colonic adenomas with either low- or high-grade dysplasia. Statistically, there were no differences between high

grade and low-grade adenomas. However, interestingly, in some cases of high-grade adenomas there was an apparent decrease in staining in the high-grade areas when compared to the low-grade areas and normal epithelia. This is particularly interesting given the differences in staining between carcinomas and adenomas, where adenomas showed statistically significantly higher levels of expression than carcinomas ( $p < 0.001$ ). HNF1B positivity was positively correlated with a benign diagnosis, suggesting that in the setting of the large intestine the role of this transcription factor may be in the form of a tumour suppressor and HNF1B may have a protective effect. In our study, on the protein level we observed the highest expression in carcinomas of the T1 stage (tumours invading to the submucosa, mean H-score 216, compared to mean H-score 173 in the T2 stage, 195 in T3 stage and 177 in T4 stage cases). This finding was also observed in TCGA colorectal cohort (Online Resource 4), where the highest expression on the mRNA level was also reported in the T1 stage, although the correlation of those data does not reach statistical significance. Furthermore, lower values of H-score were associated with a recurring disease ( $p = 0.043$ ). It has been suggested that HNF1B could act as a control switch, which in healthy, non-tumour tissue prevents epithelial-mesenchymal transition [21]. This hypothesis is further supported by their finding that the key biological processes related to HNF1B and HNF1B-related gene network (consisting of over 30 genes, especially FLRT3 and SLC14A1) are chemotaxis and cadherin-mediated adhesion to the extracellular matrix. The downregulation of HNF1B in advanced stages of colorectal carcinoma and in recurrent disease could therefore be attributed to a more invasive phenotype of the disease, brought on by a decrease of HNF1B functional effect. This hypothesis is further supported by the results of our survival analyses, which showed that there was a statistically significant association between HNF1B expression and DFS ( $p = 0.014$ ), where lower levels of HNF1B expression were associated with adverse outcome and shorter DFS. However, neither of the other two other monitored outcomes (LFS and MFS) reached significant values.

When focusing on the histological type of studied adenocarcinomas, the analysis of TCGA data revealed that there was a significantly ( $p = 0.022$ , Online Resource 4) lower expression of HNF1B on mRNA level in the group of mucinous carcinomas when compared to the non-mucinous types. Our data set was limited by the small number of mucinous carcinomas ( $n = 11$ ) and the statistical results did not reach significant levels ( $p = 0.469$ ). Nonetheless, they do suggest a similar trend and also hint at the lower levels of HNF1B expression in mucinous carcinomas.

The detected lower expression of HNF1B in colorectal carcinomas when compared to adenomas could represent a consequence of a defective intestinal cell differentiation, which is reportedly coordinated by a complex network of transcription factors, among which HNF1, CDX2 and GATA4 are the most

important [45]. The suggested protective effect of HNF1B in colorectal carcinoma would place CRC, together with chromophobe RCC and WT, amongst the handful of solid cancers, where this tumour suppressive effect has been proposed [1, 35]. In contrast with this group, there is a much larger list of cancers where HNF1B was reported to act as a protooncogene. The most important among these are clearly the tumours characterised by the clear appearance of the cytoplasm, namely OCCC and RCC. It has been suggested that HNF1B may be induced within the stressful environment of endometriotic cysts, leading to alterations in intracellular metabolism and enhanced aerobic glycolysis, which results in a significant survival advantage of cancerous cells, as well as the chemoresistant phenotype of this cancer [47]. Other tumours in this group include prostate carcinoma, yolk sac tumour (YST), hepatocellular carcinoma (HCC) and oncogenic potential is also attributed to HNF1B in malignant glioma [9, 48, 49].

## Conclusion

Apart from the role HNF1B plays in the pathogenesis of certain developmental disorders, in recent years it is also being discussed as a tissue-specific tumour suppressor or an oncogene which plays an important role in the development and progression of several tumours. We have performed a comprehensive analysis of the involvement of HNF1B in the setting of benign and malignant lesions of the large intestine, focusing especially on the expression, epigenetic and genetic changes in colorectal carcinoma and its possible use in differential diagnosis or when assessing prognosis. We have revealed infrequent somatic mutations and promoter methylation in our cohort. We have also found that on a protein level, higher HNF1B expression is significantly associated with colonic adenomas when compared to carcinomas. From a prognostic standpoint we observed that there is a significant relationship between the levels of HNF1B expression and recurrence, where a lower expression seems to be associated with a recurring disease. Decreased expression was associated with a decreased DFS. These results suggest that in the context of colorectal cancer, HNF1B may in fact play a part in the pathogenesis and act in a tumour suppressive fashion. However, more studies on larger cohorts are needed to precisely understand the mechanisms at play and the true possible significance of HNF1B in the lesions of large intestine.

**Acknowledgements** This work was supported by Ministry of Health, Czech Republic (Research project AZV 17-28404A and Conceptual development of research organization 64165, General University Hospital in Prague), by Charles University (Project Progress Q28/LF1 and SVV 260367), and by European Regional Development Fund (CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_046/001/5959; BBMRI\_CZ LM2018125, and OPVK - Research Laboratory of Tumor Diseases, CZ.2.16/3.1.00/24509). Special thanks belong to Zachary H.K. Kendall, B.A. for the English editing.

**Author Contributions** All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, samples and clinical data collection: Michaela Bártů, Vladimír Frýba. Preparation and analysis of samples: Michaela Bártů, Kristýna Němejcová, Nikola Hájková, Jan Hojný, Eva Krkavcová, Karol Simon. Statistical analyses and data interpretation: Romana Michálková, Ivana Stružinská, Michaela Bártů, Kristýna Němejcová, Pavel Dundr. Writing – original draft preparation: Michaela Bártů, Nikola Hájková, Jan Hojný, Ivana Stružinská, Pavel Dundr, Romana Michálková. Writing – review and editing: Ivana Stružinská, Pavel Dundr, Kristýna Němejcová. All authors discussed the results, commented on the manuscript, and approved the final manuscript.

**Data Availability** The source data are included in this article and its supplementary Online Resource files are available from the corresponding author upon reasonable request.

### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interests** The authors declare no competing financial and/or non-financial interests.

### References

- Liu Y, Kanyomse Q, Xie Y (2019) Tumor-suppressive activity of Hnf1beta in Wilms' tumor. *Biosci Biotechnol Biochem* 83(11):2008–2015. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1611409>
- Yu DD, Guo SW, Jing YY, Dong YL, Wei LX (2015) A review on hepatocyte nuclear factor-1beta and tumor. *Cell Biosci* 5:58. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0049-3>
- Carithers LJ, Ardlie K, Barcus M, Branton PA, Britton A, Buia SA, Compton CC, DS DL, Peter-Demchok J, Gelfand ET, Guan P, Korzeniewski GE, Lockhart NC, Rabiner CA, Rao AK, Robinson KL, Roche NV, Sawyer SJ, Segre AV, Shive CE, Smith AM, Sobin LH, Undale AH, Valentino KM, Vaught J, Young TR, Moore HM, Consortium GT (2015) A novel approach to high-quality postmortem tissue procurement: the GTEx project. *Biopreserv Biobank* 13(5):311–319. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0032>
- Pontoglio M (2000) Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 11(Suppl 16):S140–S143
- Suzuki E, Kajita S, Takahashi H, Matsumoto T, Tsuruta T, Saegusa M (2015) Transcriptional upregulation of HNF-1beta by NF-kappaB in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression. *Lab Invest* 95(8):962–972. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.73>
- Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, Yasugi T, Taketani Y, Hirohashi S (2003) Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 163(6):2503–2512
- Adalat S, Woolf AS, Johnstone KA, Wirsing A, Harries LW, Long DA, Hennekam RC, Ledermann SE, Rees L, van't Hoff W, Marks SD, Trompeter RS, Tullus K, Winyard PJ, Cansick J, Mushtaq I, Dhillon HK, Bingham C, Edghill EL, Shroff R, Stanescu H, Ryffel GU, Ellard S, Bockenbauer D (2009) HNF1B mutations associate with hypomagnesemia and renal magnesium wasting. *J Am Soc Nephrol* 20(5):1123–1131. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008060633>
- Anik A, Catli G, Abaci A, Bober E (2015) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab* 28(3–4):251–263. <https://doi.org/10.1515/jpem-2014-0384>
- Debiais-Delpech C, Godet J, Pedretti N, Bernard FX, Irani J, Cathelineau X, Cussenot O, Fromont G (2014) Expression patterns of candidate susceptibility genes HNF1beta and CtBP2 in prostate cancer: association with tumor progression. *Urol Oncol* 32(4):426–432. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.09.006>
- Elliott KS, Zeggini E, McCarthy MI, Gudmundsson J, Sulem P, Stacey SN, Thorlacius S, Amundadottir L, Gronberg H, Xu J, Gaboricau V, Eeles RA, Neal DE, Donovan JL, Hamdy FC, Muir K, Hwang SJ, Spitz MR, Zanke B, Carvajal-Carmona L, Brown KM, Australian Melanoma Family Study I, Hayward NK, Macgregor S, Tomlinson IP, Lemire M, Amos CI, Murabito JM, Isaacs WB, Easton DF, Brennan P, PanScan C, Barkardottir RB, Gudbjartsson DF, Rafnar T, Hunter DJ, Chanock SJ, Stefansson K, Ioannidis JP (2010) Evaluation of association of HNF1B variants with diverse cancers: collaborative analysis of data from 19 genome-wide association studies. *PLoS One* 5(5):e10858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010858>
- Glinisky GV, Gliniskii AB, Stephenson AJ, Hoffman RM, Gerald WL (2004) Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer. *J Clin Invest* 113(6):913–923. <https://doi.org/10.1172/JCI20032>
- Janky R, Binda MM, Allemeersch J, Van den Broeck A, Govaere O, Swinnen JV, Roskams T, Aerts S, Topal B (2016) Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 16:632. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2540-6>
- Kondratyeva LG, Chernov IP, Zinoviyeva MV, Kopantzev EP, Sverdlov ED (2017) Expression of master regulatory genes of embryonic development in pancreatic tumors. *Dokl Biochem Biophys* 475(1):250–252. <https://doi.org/10.1134/S1607672917040020>
- Spurdle AB, Thompson DJ, Ahmed S, Ferguson K, Healey CS, O'Mara T, Walker LC, Montgomery SB, Dermitzakis ET, Australian National Endometrial Cancer Study G, Fahey P, Montgomery GW, Webb PM, Fasching PA, Beckmann MW, Ekici AB, Hein A, Lambrechts D, Coeneegrachts L, Vergote I, Amant F, Salvesen HB, Trovik J, Njolstad TS, Helland H, Scott RJ, Ashton K, Proietto T, Otton G, National Study of Endometrial Cancer Genetics G, Tomlinson I, Gorman M, Howarth K, Hodgson S, Garcia-Closas M, Wentzensen N, Yang H, Chanock S, Hall P, Czene K, Liu J, Li J, Shu XO, Zheng W, Long J, Xiang YB, Shah M, Morrison J, Michailidou K, Pharoah PD, Dunning AM, Easton DF (2011) Genome-wide association study identifies a common variant associated with risk of endometrial cancer. *Nat Genet* 43(5):451–454. <https://doi.org/10.1038/ng.812>
- Yamamoto S, Tsuda H, Aida S, Shimazaki H, Tamai S, Matsubara O (2007) Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor 1beta in ovarian and endometrial clear-cell adenocarcinomas and nonneoplastic endometrium. *Hum Pathol* 38(7):1074–1080. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.12.018>
- Rebouissou S, Vasilu V, Thomas C, Bellanne-Chantelot C, Bui H, Chretien Y, Timsit J, Rosty C, Laurent-Puig P, Chauveau D, Zucman-Rossi J (2005) Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* 14(5):603–614. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi057>
- Painter JN, O'Mara TA, Batra J, Cheng T, Lose FA, Dennis J, Michailidou K, Tyrer JP, Ahmed S, Ferguson K, Healey CS, Kaufmann S, Hillman KM, Walpole C, Moya L, Pollock P, Jones A, Howarth K, Martin L, Gorman M, Hodgson S, National Study of Endometrial Cancer Genetics G, Consortium C, De Polanco MM, Sans M, Carracedo A, Castellvi-Bel S, Rojas-Martinez A, Santos E, Teixeira MR, Carvajal-Carmona L, Shu XO, Long J, Zheng W, Xiang YB, Australian National Endometrial Cancer Study G, Montgomery GW, Webb PM, Scott RJ, McEvoy M, Attia J,



- Holliday E, Martin NG, Nyholt DR, Henders AK, Fasching PA, Hein A, Beckmann MW, Renner SP, Dork T, Hillemanns P, Durst M, Runnebaum I, Lambrechts D, Coeneegrachts L, Schrauwen S, Amant F, Winterhoff B, Dowdy SC, Goode EL, Teoman A, Salvesen HB, Trovik J, Njolstad TS, Werner HM, Ashton K, Proietto T, Otton G, Tzortzatos G, Mints M, Tham E, Rendocas HP, Czene K, Liu J, Li J, Hopper JL, Southey MC, Australian Ovarian Cancer S, Ekici AB, Ruebner M, Johnson N, Peto J, Burwinkel B, Marme F, Brenner H, Dieffenbach AK, Meindl A, Brauch H, Network G, Lindblom A, Depreeuw J, Moisse M, Chang-Claude J, Rudolph A, Couch FJ, Olson JE, Giles GG, Bruinsma F, Cunningham JM, Fridley BL, Borresen-Dale AL, Kristensen VN, Cox A, Swerdlow AJ, Orr N, Bolla MK, Wang Q, Weber RP, Chen Z, Shah M, French JD, Pharoah PD, Dunning AM, Tomlinson I, Easton DF, Edwards SL, Thompson DJ, Spurdle AB (2015) Fine-mapping of the HNF1B multicancer locus identifies candidate variants that mediate endometrial cancer risk. *Hum Mol Genet* 24(5):1478–1492. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu552>
18. Setiawan VW, Haessler J, Schumacher F, Cote ML, Deelman E, Fesinmeyer MD, Henderson BE, Jackson RD, Vockler JS, Wilkens LR, Yasmine S, Haiman CA, Peters U, Le Marchand L, Kooperberg C (2012) HNF1B and endometrial cancer risk: results from the PAGE study. *PLoS One* 7(1):e30390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030390>
19. Berndt SI, Sampson J, Yeager M, Jacobs KB, Wang Z, Hutchinson A, Chung C, Orr N, Wacholder S, Chatterjee N, Yu K, Kraft P, Feigelson HS, Thun MJ, Diver WR, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher FR, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Crawford ED, Haiman C, Henderson B, Kolonel L, Le Marchand L, Siddiq A, Riboli E, Travis RC, Kaaks R, Isaacs W, Isaacs S, Wiley KE, Gronberg H, Wiklund F, Stattin P, Xu J, Zheng SL, Sun J, Vatten LJ, Hveem K, Njolstad I, Gerhard DS, Tucker M, Hayes RB, Hoover RN, Fraumeni JF Jr, Hunter DJ, Thomas G, Chanock SJ (2011) Large-scale fine mapping of the HNF1B locus and prostate cancer risk. *Hum Mol Genet* 20(16):3322–3329. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr213>
20. Hindorf LA, Gillanders EM, Manolio TA (2011) Genetic architecture of cancer and other complex diseases: lessons learned and future directions. *Carcinogenesis* 32(7):945–954. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr056>
21. Ross-Adams H, Ball S, Lawrenson K, Halim S, Russell R, Wells C, Strand SH, Omtoft TF, Larson M, Armasu S, Massie CE, Asim M, Mortensen MM, Borre M, Woodfine K, Warren AY, Lamb AD, Kay J, Whitaker H, Ramos-Montoya A, Murrell A, Sorensen KD, Fridley BL, Goode EL, Gayther SA, Masters J, Neal DE, Mills IG (2016) HNF1B variants associate with promoter methylation and regulate gene networks activated in prostate and ovarian cancer. *Oncotarget* 7(46):74734–74746. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12543>
22. Matsui A, Fujimoto J, Ishikawa K, Ito E, Goshima N, Watanabe S, Semba K (2016) Hepatocyte nuclear factor 1 beta induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition. *FEBS Lett* 590(8):1211–1221. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12147>
23. Bosman FT, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (2010) WHO classification of tumours of the digestive system. World Health Organization classification of tumours, vol 3, 4th edn. International Agency for Research on Cancer, Lyon
24. Specht E, Kaemmerer D, Sanger J, Wirtz RM, Schulz S, Lupp A (2015) Comparison of immunoreactive score, HER2/neu score and H score for the immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Histopathology* 67(3):368–377. <https://doi.org/10.1111/his.12662>
25. Gregova M, Hohny J, Nemejcova K, Bartu M, Mara M, Boudova B, Laco J, Krbal L, Ticha I, Dunder P (2019) Leiomyoma with bizarre nuclei: a study of 108 cases focusing on clinicopathological features, morphology, and fumarate hydratase alterations. *Pathol Oncol Res.* <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00739-5>
26. Ticha I, Hohny J, Michalkova R, Kodet O, Krkavcova E, Hajkova N, Nemejcova K, Bartu M, Jaksa R, Dura M, Kanwal M, Martinikova AS, Macurek L, Zemankova P, Kleibl Z, Dunder P (2019) A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci Rep* 9(1):17050. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53636-x>
27. Ticha I, Hohny J, Michalkova R, Kodet O, Krkavcova E, Hajkova N, Nemejcova K, Bartu M, Jaksa R, Dura M, Kanwal M, Martinikova AS, L Macurek, Zemankova P, Kleibl Z, Dunder P (2019) A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci Rep* Accepted for publication
28. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R (2002) Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 123(6):1804–1811. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.37070>
29. Shen H, Fridley BL, Song H, Lawrenson K, Cunningham JM, Ramus SJ, Cicek MS, Tyrer J, Stram D, Larson MC, Kobel M, Consortium P, Ziogas A, Zheng W, Yang HP, Wu AH, Wozniak EL, Woo YL, Winterhoff B, Wik E, Whittemore AS, Wentzensen N, Weber RP, Vitonis AF, Vincent D, Vierkant RA, Vergote I, Van Den Berg D, Van Altena AM, Tworoger SS, Thompson PJ, Tessier DC, Terry KL, Teo SH, Templeman C, Stram DO, Southey MC, Sieh W, Siddiqui N, Shvetsov YB, Shu XO, Shridhar V, Wang-Gohrke S, Severi G, Schwaab I, Salvesen HB, Rzepecka IK, Runnebaum IB, Rossing MA, Rodriguez-Rodriguez L, Risch HA, Renner SP, Poole EM, Pike MC, Phelan CM, Peltari LM, Pejovic T, Paul J, Orlov I, Omar SZ, Olson SH, Odunsi K, Nickels S, Nevanlinna H, Ness RB, Narod SA, Nakanishi T, Moysich KB, Monteiro AN, Moes-Sosnowska J, Modugno F, Menon U, McLaughlin JR, McGuire V, Matsuo K, Adenan NA, Massuger LF, Lurie G, Lundvall L, Lubinski J, Lissowska J, Levine DA, Leminen A, Lee AW, Le ND, Lambrechts S, Lambrechts D, Kupryjanczyk J, Krakstad C, Konecny GE, Kjaer SK, Kiemeny LA, Kelenen LE, Keeney GL, Karlan BY, Karevan R, Kalli KR, Kajiyama H, Ji BT, Jensen A, Jakubowska A, Iversen E, Hosono S, Hogdall CK, Hogdall E, Hoatlin M, Hillemanns P, Heitz F, Hein R, Harter P, Halle MK, Hall P, Gronwald J, Gore M, Goodman MT, Giles GG, Gentry-Maharaj A, Garcia-Closas M, Flanagan JM, Fasching PA, Ekici AB, Edwards R, Eccles D, Easton DF, Durst M, du Bois A, Dork T, Doherty JA, Despierre E, Dansonka-Mieszkowska A, Cybulski C, Cramer DW, Cook LS, Chen X, Charbonneau B, Chang-Claude J, Campbell I, Butzow R, Bunker CH, Brueggemann D, Brown R, Brooks-Wilson A, Brinton LA, Bogdanova N, Block MS, Benjamin E, Beesley J, Beckmann MW, Bandera EV, Baglietto L, Bacot F, Armasu SM, Antonenkova N, Anton-Culver H, Aben KK, Liang D, Wu X, Lu K, Hildebrandt MA, Australian Ovarian Cancer Study G, Australian Cancer S, Schildkraut JM, Sellers TA, Huntsman D, Berchuck A, Chenevix-Trench G, Gayther SA, Pharoah PD, Laird PW, Goode EL, Pearce CL (2013) Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat Commun* 4:1628. <https://doi.org/10.1038/ncomms2629>
30. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL (2008) Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 3(12):1903–1908. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.191>
31. Lau HH, Ng NHJ, Loo LSW, Jasmen JB, Teo AKK (2018) The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - in and beyond the liver. *J Hepatol* 68(5):1033–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.026>

32. Rezaenejad H, Ouziel-Yahalom L, Keyzer CA, Sullivan BA, Hollister-Lock J, Li WC, Guo L, Deng S, Lei J, Markmann J, Bonner-Weir S (2018) Heterogeneity of SOX9 and HNF1beta in pancreatic ducts is dynamic. *Stem Cell Reports* 10(3):725–738. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.028>
33. Senkel S, Lucas B, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (2005) Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim Biophys Acta* 1731(3):179–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbexp.2005.10.003>
34. Kobel M, Kalloger SE, Carrick J, Huntsman D, Asad H, Oliva E, Ewanowich CA, Soslow RA, Gilks CB (2009) A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol* 33(1):14–21. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181788546>
35. Lebrun G, Vasiliu V, Bellanne-Chantelot C, Bensman A, Uliniski T, Chretien Y, Grunfeld JP (2005) Cystic kidney disease, chromophobe renal cell carcinoma and TCF2 (HNF1 beta) mutations. *Nat Clin Pract Nephrol* 1(2):115–119. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0054>
36. Nemejcova K, Cibula D, Dundr P (2015) Expression of HNF-1beta in cervical carcinomas: an immunohistochemical study of 155 cases. *Diagn Pathol* 10:8. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0245-9>
37. Bartu M, Dundr P, Nemejcova K, Ticha I, Hojny H, Hajkova N (2018) The role of HNF1B in tumorigenesis of solid Tumours: a review of current knowledge. *Folia Biol (Praha)* 64(3):71–83
38. Harries LW, Perry JR, McCullagh P, Crundwell M (2010) Alterations in LMTK2, MSMB and HNF1B gene expression are associated with the development of prostate cancer. *BMC Cancer* 10:315. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-315>
39. Kim HJ, Bae JS, Lee J, Chang IH, Kim KD, Shin HD, Han JH, Lee SY, Kim W, Myung SC (2011) HNF1B polymorphism associated with development of prostate cancer in Korean patients. *Urology* 78(4):969 e961–969 e966. <https://doi.org/10.1016/j.urolgy.2011.06.045>
40. Mandato VD, Farnetti E, Tomicelli F, Abrate M, Casali B, Ciarlina G, Pirillo D, Gelli MC, Nicoli D, Grassi M, LAS GB, Palomba S (2015) HNF1B polymorphism influences the prognosis of endometrial cancer patients: a cohort study. *BMC Cancer* 15:229. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1246-5>
41. Kountourakis P, Souglakos J, Gouvas N, Androulakis N, Athanasiadis A, Boukovinas I, Christodoulou C, Chrysou E, Dervenis C, Emmanouilidis C, Georgiou P, Karachaliou N, Katopodi O, Makatsoris T, Papakostas P, Pentheroudakis G, Pilpilidis I, Sgouros J, Tekkis P, Triantopoulou C, Tzardi M, Vassiliou V, Vini L, Xynogalos S, Xynos E, Ziras N, Papamichael D (2016) Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol* 29(1):18–23
42. Silva TD, Vidigal VM, Felipe AV, DEL JM, Neto RA, Saad SS, Forones NM (2013) DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett* 6(6):1687–1692. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1606>
43. Terasawa K, Toyota M, Sagae S, Ogi K, Suzuki H, Sonoda T, Akino K, Maruyama R, Nishikawa N, Imai K, Shinomura Y, Saito T, Tokino T (2006) Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. *Br J Cancer* 94(6):914–921. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602984>
44. Suaud L, Joseph B, Formstecher P, Laine B (1997) mRNA expression of HNF-4 isoforms and of HNF-1alpha/HNF-1beta variants and differentiation of human cell lines that mimic highly specialized phenotypes of intestinal epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 235(3):820–825. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6888>
45. Yang R, Kerschner JL, Harris A (2016) Hepatocyte nuclear factor 1 coordinates multiple processes in a model of intestinal epithelial cell function. *Biochim Biophys Acta* 1859(4):591–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.005>
46. D'Angelo A, Bluteau O, Garcia-Gonzalez MA, Gresh L, Doyen A, Garbay S, Robine S, Pontoglio M (2010) Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development* 137(9):1573–1582. <https://doi.org/10.1242/dev.044420>
47. Amano Y, Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, Khanna B, Baba T, Abiko K, Hamanishi J, Yoshioka Y, Konishi I (2015) Metabolic alterations caused by HNF1beta expression in ovarian clear cell carcinoma contribute to cell survival. *Oncotarget* 6(28):26002–26017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4692>
48. Rougemont AL, Tille JC (2018) Role of HNF1beta in the differential diagnosis of yolk sac tumor from other germ cell tumors. *Hum Pathol* 81:26–36. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.04.025>
49. Zheng J, Liu X, Xue Y, Gong W, Ma J, Xi Z, Que Z, Liu Y (2017) TTBK2 circular RNA promotes glioma malignancy by regulating miR-217/HNF1beta/Derlin-1 pathway. *J Hematol Oncol* 10(1):52. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0422-2>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



OPEN

# Analysis of expression, epigenetic, and genetic changes of HNF1B in 130 kidney tumours

Michaela Bártů<sup>1✉</sup>, Jan Hojný<sup>1</sup>, Nikola Hájková<sup>1</sup>, Romana Michálková<sup>1</sup>, Eva Krkavcová<sup>1</sup>, Ladislav Hadravský<sup>1</sup>, Lenka Kleissnerová<sup>1</sup>, Quang Hiep Bui<sup>1</sup>, Ivana Stružinská<sup>1</sup>, Kristýna Němejcová<sup>1</sup>, Otakar Čapoun<sup>2</sup>, Monika Šlemendová<sup>2</sup> & Pavel Dundr<sup>1✉</sup>

Hepatocyte nuclear factor 1 beta (HNF1B) is a transcription factor which plays a crucial role in nephronogenesis, and its germline mutations have been associated with kidney developmental disorders. However, the effects of HNF1B somatic exonic mutations and its role in the pathogenesis of kidney tumours has not yet been elucidated. Depending on the type of the tumour HNF1B may act as a tumour suppressor or oncogene, although the exact mechanism by which HNF1B participates in the process of cancerogenesis is unknown. Using an immunohistochemical approach, and methylation and mutation analysis, we have investigated the expression, epigenetic, and genetic changes of HNF1B in 130 cases of renal tumours (121 renal cell carcinomas, 9 oncocytomas). In the subset of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), decreased HNF1B expression was associated with a higher tumour grade and higher T stage. The mutation analysis revealed no mutations in the analysed samples. Promoter methylation was detected in two ccRCCs and one oncocytoma. The results of our work on a limited sample set suggest that while in papillary renal cell carcinoma HNF1B functions as an oncogene, in ccRCC and chRCC it may act in a tumour suppressive fashion.

Hepatocyte nuclear factor 1 beta (*HNF1B*, previously also known as *TCF2*) is a tissue-specific, developmentally regulated transcription factor which is crucial for the embryonic development of organs derived from ventral endoderm, including the kidneys, pancreas, gastrointestinal system, liver, biliary tract and genital tract<sup>1,2</sup>. *HNF1B* is located at chromosome 17q12 and plays a crucial role in the early stages of nephron development, as it is required for the activation of a segment-specific gene expression program responsible for the development of nephrons<sup>3</sup>. Heterozygous germline mutations of *HNF1B* are the most common monogenic cause of developmental kidney disease and are associated with a wide variety of congenital kidney malformations, which ultimately lead to chronic renal disease in the afflicted individuals<sup>4-7</sup>. The disease phenotype especially includes Renal Cysts and Diabetes Syndrome (RCAD, OMIM #137920), which may also be associated with the dysfunction of pancreatic  $\beta$ -cells, leading to a subtype of diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young, MODY5)<sup>8-11</sup>.

To date, more than 100 different germline *HNF1B* mutations scattered across the gene have been reported in literature, all presenting with a varied range of phenotypes of associated kidney, urogenital tract, and pancreas disorders<sup>8,12</sup>. They comprise mainly base substitutions, small insertion-deletions, or whole-gene deletions which are inherited in an autosomal dominant fashion, although up to 50% of them arise de novo<sup>5,10,13</sup>.

While the role of HNF1B in developmental kidney anomalies has already been well established, its role in the pathogenesis of kidney tumours has not yet been elucidated, despite there being an increasing number of studies pointing to its involvement in the pathogenesis of several types of cancers, including kidney cancer.

As yet, the effects of somatic exonic mutations of *HNF1B* on cancerogenesis and tumour development have not been fully explained, although there are several genome-wide association studies (GWAS) which have identified several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *HNF1B* gene as associated with either an increased or a decreased risk of prostate cancer<sup>14,15</sup>, endometrial cancer<sup>16,17</sup>, and even kidney cancer<sup>18</sup>. According to literature, HNF1B protein may act as either a protooncogene or a tumour suppressor depending on the type of tumour and its histogenesis<sup>15,19,20</sup>. Nonetheless, the precise mechanism by which HNF1B participates in the process of cancerogenesis is unknown, and probably differs in different types of tumours.

Although HNF1B plays such a profound role in the development of the kidneys, knowledge about its involvement in the pathogenesis of kidney tumours is sparse, with only a handful of published studies focusing on the

<sup>1</sup>Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Studnickova 2, 12800 Prague 2, Czech Republic. <sup>2</sup>Department of Urology, General University Hospital in Prague, 12808 Prague, Czech Republic. ✉email: michaela.bartu@vfn.cz; pavel.dundr@vfn.cz

Group	N	H-score mean	H-score median	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	Categorized H-score			
					Group 1	Group 2	Group 3	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
<b>Diagnosis</b>								
ccRCC	93	201.3	250	<b>&lt;0.001</b>	22	18	53	<b>0.004</b>
chRCC	11	35.5	0		9	2	0	
papRCC	17	201.8	270		5	3	9	
RO	9	162.2	170		3	3	3	

**Table 1.** Association of HNF1B expression and type of diagnosis, based on 130 cases of renal cell carcinoma. Statistically significant results (*p*-value < 0.05) are highlighted in bold. *ccRCC* clear cell renal cell carcinoma, *chRCC* chromophobe renal cell carcinoma, *papRCC* papillary renal cell carcinoma, *RO* renal oncocytoma. <sup>a</sup>*p* values are based on Mann–Whitney U-test or Kruskal–Wallis H-test. <sup>b</sup>*p* values are based on Pearson chi-squared test (categorized expression).

relationship between HNF1B and malignant or benign kidney lesions<sup>3, 21–23</sup>. Malignant kidney tumours make up to 2% of all cancers and, until recently, their incidence had been constantly rising<sup>24, 25</sup>. The most common histologic subtype is clear cell renal cell carcinoma (ccRCC, 70–80%), followed by papillary renal cell carcinoma (papRCC, 10–20%), and chromophobe renal cell carcinoma (chRCC, 5%)<sup>26</sup>. The landscape of molecular aberrations implicated in the pathogenesis of kidney tumours is very diverse and includes both chromosomal gains and losses, with a number of genes (such as *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *MET*, *FH*) already being established as key players in the development of RCC<sup>27</sup>. The role of others, including HNF1B, still remains to be elucidated.

Therefore, our aim was to perform a comprehensive analysis of the expression, epigenetic, and genetic changes of HNF1B in kidney tumours, and to further investigate its potential differential diagnostic, prognostic and therapeutic value, mainly at the level of somatic changes.

## Material and methods

**Samples.** The study was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks and, where available, the corresponding fresh-frozen tissue (FT) stored in the RNeasy stabilization solution (Qiagen) at –80 °C according to the manufacturer’s protocol (Stabilization of RNA in Harvested Animal Tissues; Qiagen), as described in our previous work<sup>28</sup>. The FFPE tissue blocks were sourced from the archives of our department and the corresponding FT samples were provided by the Bank of Biological Material (BBM) of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague.

A total of 130 FFPE tissue samples (Table 1) were used for the immunohistochemical analysis, consisting of 93 cases of clear cell renal cell carcinoma, 17 cases of papillary renal cell carcinoma, 11 cases of chromophobe renal cell carcinoma, and 9 cases of renal oncocytoma (RO). Out of these 130 cases there were 56 cases (42 ccRCC, 2 papRCC, 3 chRCC, 9 oncocytomas) with available corresponding FT sample pairs (tumour and in some cases non-tumour tissue), which were used for DNA isolation and subsequently mutation and promoter methylation analysis. The clinicopathologic characteristics (analysed for the ccRCC subset of samples) are summarized in Table 2. The main evaluated parameters included tumour stage (TNM) and grade where applicable (according to the 4th Edition of WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs and International Society of Urological Pathology)<sup>29</sup>, lymphovascular invasion, presence of metastases, recurrence, gender, and age at the time of diagnosis. The hematoxylin and eosin-stained slides of all of the selected kidney tumour samples were reviewed and suitable tumour areas were marked for the removal of individual tissue cores, which were used for the construction of tissue microarrays (TMAs). From each tumour donor block two tissue cores (each 2.0 mm in diameter) were drilled using the tissue microarray instrument TMA Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary) and the evaluation of the studied tumours was performed with the use of TMAs.

**Ethical approval.** The study has been approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague in compliance with the Helsinki Declaration (ethical approval number 41/16 Grant VES 2017 AZV VFN). The Ethics Committee did not require the procurement of informed consent, given that according to the Czech Law (Act. no. 373/11, and its amendment Act no. 202/17) it is not necessary to provide informed consent in fully anonymized studies.

**DNA isolation and quality control.** The DNA isolation process was performed as described in our previously published study focusing on the problematics of HNF1B<sup>28</sup>. All of the analysed DNA was obtained from FT samples (stored in RNeasy), which were first thawed, and then homogenized (10–30 mg of the tissue) using MagNA Lyser Green Beads tubes in a MagNA Lyser Instrument (Roche) in the presence of 600 µl of RLT Plus buffer (Qiagen) with 6 µl of 14.3 M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). The total DNAs and RNAs were isolated according to the Simultaneous Purification of Genomic DNA and Total RNA from Animal Tissues protocol by using an AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen). The quantification of the isolated DNA samples was carried out with the use of NanoDrop 2000 (Thermo Fisher).

**Immunohistochemical analysis.** Using the constructed TMAs, the immunohistochemical (IHC) analysis was performed on all of the kidney tumour samples using the standard 4 µm thick sections of FFPE tissue,

Characteristic	Group	N	H-score mean	H-score median	p-value <sup>a</sup>	Categorized H-score			
						Group 1	Group 2	Group 3	p-value <sup>b</sup>
Gender					0.617				0.399
	Male	54	198.2	240		12	13	29	
	Female	39	205.8	250		10	5	24	
Age (mean = 63, median = 65)					0.849				0.414
	< 65	44	198.9	240		8	8	28	
	≥ 65	49	203.5	260		14	10	25	
pT classification					0.094				0.360
	pT1	70	212.4	265		15	11	44	
	pT2	6	141.7	145		2	2	2	
	pT3	17	177.1	170		5	5	7	
Grade					<b>0.002</b>				<b>0.012</b>
	G1	22	255.5	300		2	2	18	
	G2	53	196.1	240		14	9	30	
	G3	13	167.7	170		3	6	4	
	G4	5	106.0	50		3	1	1	
Lymphovascular invasion <sup>*</sup>					0.264				0.558
	Yes	15	177.3	200		5	3	7	
	No	75	207.1	260		16	14	45	
Metastasis <sup>*</sup>					0.121				0.135
	Yes	10	158.0	140		3	4	3	
	No	81	207.8	250		18	14	49	
Recurrence <sup>*</sup>					0.458				0.899
	Yes	8	183.8	210		2	2	4	
	No	83	204.1	250		19	16	48	
rs4430796 <sup>*</sup>					0.727				0.951
	Yes	31	207.7	270		6	2	21	
	No	8	276.3	295		0	1	5	
rs757210 <sup>*</sup>					0.384				0.528
	Yes	36	216.1	275		0	0	3	
	No	3	290.0	290		6	3	23	

**Table 2.** Association of HNF1B expression and clinicopathological characteristics, based on 93 cases of ccRCC. Statistically significant results ( $p$ -value < 0.05) are highlighted in bold. <sup>a</sup> $p$  values are based on Mann–Whitney U-test or Kruskal–Wallis H-test. <sup>b</sup> $p$  values are based on Pearson chi-squared test (categorized expression). \*Data are not available for all cases.

in accordance with methodology described in our previous work<sup>28</sup>. The slides were stained with the automated staining instrument Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland) with a rabbit antibody against the HNF1B protein (polyclonal, dilution 1:500, product no. HPA002083, Sigma-Aldrich, Prestige Antibodies, St. Louis, United States). The heat induced epitope retrieval with a citrate buffer (pH 6.0) was used for pre-treatment. The detection of the primary antibody was visualized with the OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana, Roche). Only the nuclear staining was evaluated as positive and the nuclear expression of HNF1B was double-blindly evaluated by two independent pathologists.

The immunohistochemical results were evaluated first according to the overall percentage of positive cells (0–100%), with the positive cells then being stratified and assessed also semi-quantitatively, using the H-score method previously described by others<sup>30</sup>. The H-score assessment method is based on determining the percentage of positive cells based on the level of staining intensity (1 + for weak intensity, 2 + for moderate and 3 + for strong intensity). The final H-score for each case is then obtained through the following formula by adding the multiplication of the different staining intensities:  $[1 \times (\% \text{ of cells } 1+) + 2 \times (\% \text{ of cells } 2+) + 3 \times (\% \text{ of cells } 3+)]$ . The final H-score value then ranges between 0 and 300.

In each of the evaluated IHC stained slides of tumour tissue cores the presence of internal negative and positive controls was also assessed. The positive control was represented by the staining of normal, non-neoplastic tubular epithelia present in each IHC run, while the negative control was provided in the form of a lack of staining in other structures (such as the connective tissue, smooth muscle, and adipose tissue).

**Statistical analyses.** All of the statistical analyses were performed with the use of the Statistica software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK). The association between HNF1B expression (using H-score as a continuous depend-

ent variable) and clinicopathological characteristics (categorical variables) was analysed with the nonparametric ANOVA approach. Based on the number of categories either the Mann–Whitney U-test (two categories) or the Kruskal–Walis H-test (three and more categories) were used. In case of the Kruskal–Walis H-test, *post-hoc* tests (pairwise multiple comparison of mean ranks) were conducted to determine which groups differed from each other. When evaluating the effect of independent clinicopathological characteristics on the categorized H-score, the Pearson chi-square test was used. Given that in the largest subset of samples (ccRCC) there were 8 / 93 cases of local or distant recurrence, survival analyses would not have yielded relevant results and therefore were not plotted. For the purposes of the chi-squared tests the H-score was categorized into three groups (group 1: H-score 0–100; group 2: H-score 101–200; group 3: H-score 201–300). All tests were two-sided and a *p*-value of less than 0.05 was considered as significant.

**Genetic and epigenetic analysis.** The molecular analyses consisted of DNA mutation analysis of the coding parts of the *HNF1B* exons with adjacent intronic sequences ( $\pm 15$  bp) and epigenetic analysis of CpG methylation in the region of the *HNF1B* promoter. The *HNF1B* mutation analysis of high-quality FT DNA samples (56 tumour and 42 paired non-tumour tissues) was performed by in-house 2-step polymerase chain reaction (PCR) amplicon next-generation sequencing (NGS). Of the 56 tumour samples, three did not meet the sufficient concentration requirements and therefore in their case the mutation analysis was not performed.

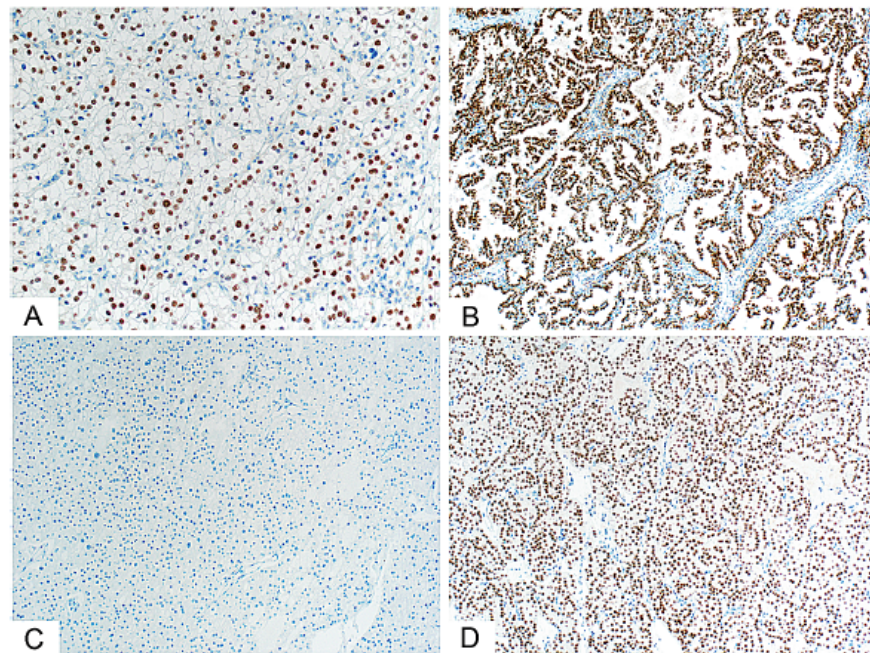
**Amplicon NGS preparation and sequencing.** The in-house 2-step PCR amplicon approach was carried out with the use of the 15 primer pairs (list of primers is provided in Supplementary Table 1) with universal adaptor sequences, which were designed to fit the specific *HNF1B* gene regions in the first PCR step. The selected *HNF1B* gene regions also included the deep intronic regions containing the rs7527210 and rs4430796 variant sites. The second PCR step was carried out with the use of a universal primer pair containing Illumina sequencing adaptor sequences (Supplementary Table 1). The first PCR step which covered the *HNF1B* target regions was performed in two separate multiplex reactions. In order to eliminate undesirable primer interactions each reaction included a different primer pair set (Supplementary Table 1). Both PCR reactions were amplified using the FastStart High Fidelity PCR System (Roche) according to the recommended standard PCR procedure (FastStart High Fidelity PCR System; Roche) in 20  $\mu$ l reactions according to the following PCR protocol: 2 min—95 °C; 10 cycles of 15 s—95 °C, 20 s—62 °C and 30 s—72 °C (all steps with ramping temperature 2 °C/s) and then 20 cycles of 15 s—95 °C, 20 s—62 °C and 30 s—72 °C (standard ramping temperature 4 °C/s). Following the first PCR step, 10  $\mu$ l of both of the first PCR reactions were equimolarly mixed and purified with the AMPure XP system (0.8  $\times$ ; Beckmann Coulter). The second PCR step was then employed in order to amplify the purified PCR product, consisting of 10 cycles using the same protocol, with a standard ramping rate and different primers (the universal primer pair with Illumina adaptor sequences was used).

When the second PCR step was completed, the concentrations of the PCR products were measured with the use of the Qubit fluorimeter (Thermo Fisher) and then equimolarly mixed to create one sequencing library. The prepared sequencing library was then purified using the AMPure XP system (0.8  $\times$ ; Beckmann Coulter) and measured for concentration (Qubit) and for fragment length using the High Sensitivity NGS Fragment Analysis kit on the Fragment Analyzer (AATI). This amplicon library was then sequenced together with different (capture) libraries in order to increase sequencing heterogeneity. The sequencing was performed either using 50 samples, which were sequenced in one amplicon library by the MiSeq 300 cycles v2 kit or using 90 samples by the NextSeq 300 cycles mid output kit v2.5. Because in all of the tested samples the amplicon sequencing approach showed a low coverage of 20 bp on the 5'-end of exon 4, this part was additionally sequenced by the Sanger sequencing method as described elsewhere<sup>31</sup> with the use of a specific primer pair (Supplementary Table 1).

**Biostatistical analysis of NGS data.** The raw data gained from the amplicon sequencing was demultiplexed and converted into the .fastq format, which was then analysed by the same pipeline using the NextGENe software (Softgenetics), as described elsewhere<sup>32</sup>. The GRCh37 genome and NM\_000458.2 reference transcript were used for the reads mapping and analysis. Only the samples with minimal coverage  $>100\times$  and variants with variant allele frequency (VAF)  $>10\%$  were chosen for further evaluation. The identified variants were manually inspected using IGV (Broad Institute) and classified according to the mutation impact<sup>32</sup>. Only the mutations of class 3, 4 or 5 (variants of unknown significance, likely pathogenic or pathogenic, respectively) were reported.

***HNF1B* promoter methylation.** For the purposes of methylation analysis, the DNA samples were subjected to bisulfite conversion DNA using the EZ DNA Methylation–Lightning Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The PCR amplification of both the methylated and unmethylated alleles was carried out using primers (Supplementary Table 1) which were designed with the software Methprimer (<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). The amplified promoter region of *HNF1B* covers 15 CpG islands and it is located – 457 to – 202 bp (GRCh37) before the *HNF1B* transcription start site (TSS).

Furthermore, this region includes the CpG island (chr17:36105517–36105518, GRCh37) the methylation of which is associated with a decreased *HNF1B* expression<sup>33</sup>, as well as the CpG islands (relative to the TSS: – 238, – 240, – 267) which, according to TCGA data, correlated the most with the expression (mRNA) of *HNF1B* in kidney tumours. In our settings we were able to detect at least 5% of methylated DNA by High Resolution Melting (HRM) Analysis of the amplified PCR products. Each run included the converted DNA samples and a series of 100%, 20%, 10%, 5 and 0% universally methylated DNA controls mixed with non-methylated DNA (Human HCT116 DKO Non-Methylated DNA and Human HCT116 DKO Methylated DNA; Zymo Research). The melting curves of the analysed samples were compared with the melting curves of the control mixes<sup>34</sup>.



**Figure 1.** Immunohistochemical staining of the HNF1B expression in kidney lesions. (A) Predominantly moderate-to-strong nuclear expression in ccRCC (200 ×). (B) Strong, diffuse nuclear expression in papRCC (100 ×). (C) Complete lack of nuclear expression in chrRCC (100 ×). (D) Moderate-to-strong diffuse nuclear expression in RO (100 ×).

## Results

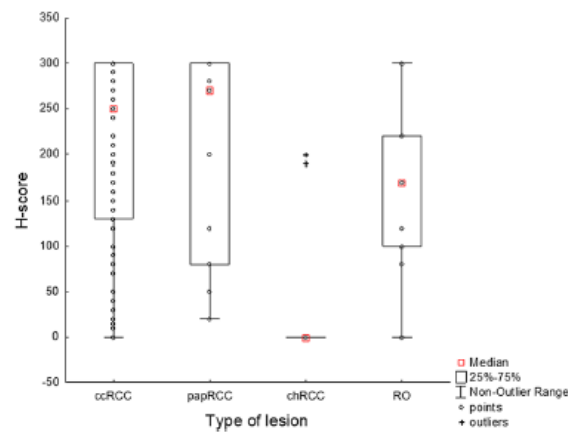
**Immunohistochemical findings.** The results of the IHC staining analysis revealed that there were significant differences in the presence and intensity of HNF1B expression among the four analysed subsets of kidney tumours ( $p < 0.001$ ). The results of HNF1B expression for all of the tumour types are summarized in Table 1. In the subset of ccRCC, papRCC and RO, virtually all of the analysed tumour samples showed a certain level of homogenous, positive nuclear expression of HNF1B, while the subset of chrRCC showed predominantly a complete negativity of the staining, with only two cases being weakly to moderately positive. Figure 1 shows representative examples of HNF1B expression in each of the assessed kidney tumour types.

The differences in expression of HNF1B (H-score) in relation to the type of kidney tumour are shown in Table 1 and Fig. 2 (also emphasizing the unbalanced sample size in each group). Subsequent post hoc test showed significant differences between the chrRCC and ccRCC groups ( $p < 0.001$ ), and also between the chrRCC and papRCC groups ( $p < 0.001$ ). No significant differences were detected between the RO and other groups.

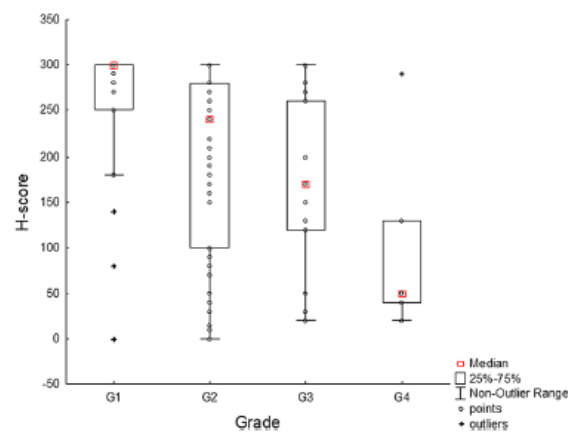
Given the unbalanced number of cases in the individual tumour subsets and their limited size, the association between HNF1B expression and clinicopathological characteristics was only analysed for the largest subset of ccRCC. The results showed that the expression of HNF1B was significantly correlated with tumour grade ( $p = 0.002$ ), where a lower expression was associated with a higher tumour grade, with the following post-hoc intergroup differences: G1 vs. G2 ( $p = 0.032$ ), G1 vs. G3 ( $p = 0.019$ ), G1 vs. G4 ( $p = 0.025$ ), G2 vs. G3 ( $p > 0.05$ ), G2 vs. G4 ( $p > 0.05$ ), G3 vs. G4 ( $p > 0.05$ ) (Fig. 3). None of the other evaluated parameters (gender, age, T stage of the tumour, lymphovascular invasion, presence of metastases, recurrence, or presence of HNF1B SNP variants) showed any association at a significant level. However, when comparing the tumours of T1a and T1b stage (it would not be reasonable to analyse other T stages due to the low number of cases in each group), there was a significant difference in the H-score between these two stages, with T1a tumours showing a higher HNF1B expression than T1b tumours (pT1a: mean = 235.8, median = 280; pT1b: mean = 181.0, median = 185,  $p = 0.046$ ; data not shown in Table 2).

**Genetic and epigenetic changes of the HNF1B gene.** *Mutation analysis.* Mutation analysis was successfully performed on 53 samples of tumour tissue (39 ccRCC, 2 papRCC, 3 chrRCC, 9 oncocytomas) and 42 samples of corresponding healthy tissue. There were no class 3–5 mutations found in the HNF1B coding regions and their flanking areas in any of the analysed samples.

As a part of the mutation analysis we also focused on the role of two of the most commonly reported SNPs associated with an increased or decreased risk of certain cancers (especially prostate and endometrial carcinoma)—the rs4430796 and rs7527210 variants. No significant association was found for either of the two SNPs and HNF1B expression.



**Figure 2.** Variability of the expression of HNF1B (H-score) in relation to the type of lesion. Analysis based on 130 cases of RCC (ccRCC: n = 93, chRCC: n = 11, papRCC: n = 17, RO: n = 9). Kruskal–Wallis H-test:  $H(3,130) = 21.96$ ,  $p < 0.001$  (for the results of the post-hoc test, see the “Results” section). One point in the graph may represent more than one case.



**Figure 3.** Variability of the expression of HNF1B (H-score) in relation to grade. Analysis based on 93 cases of ccRCC (G1: n = 22, G2: n = 53, G3: n = 15, G4: n = 5). Kruskal–Wallis H-test:  $H(3,93) = 14.50$ ,  $p = 0.002$  (for the results of the post-hoc test, see the “Results” section). One point in the graph may represent more than one case.

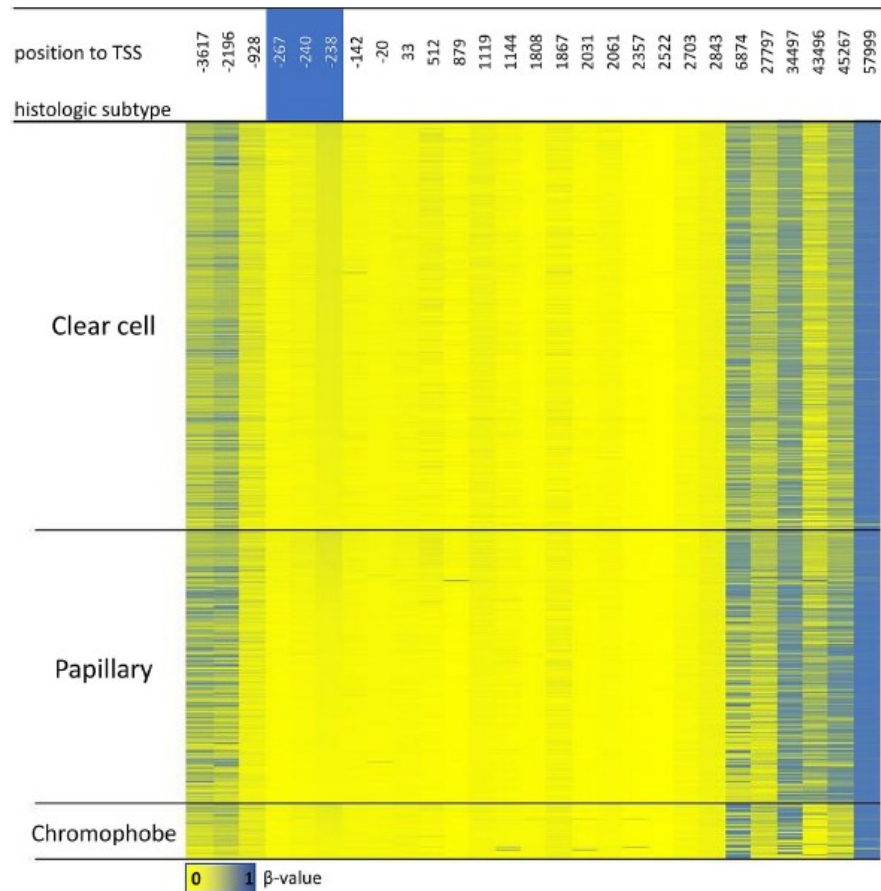
**Epigenetic analysis.** The *HNF1B* promoter methylation analysis was performed on the total of 53 samples of tumour tissue and 39 samples of corresponding healthy tissue, which underwent the bisulphite DNA conversion. Promoter methylation was detected in 2/39 ccRCC (5.1%) and 1/9 (11.1%) RO. In all three of these cases the detected methylation was weak (5–10%, H-score of these tumours was 300 and 10 for the ccRCC, and 300 for the RO). Non-tumour tissue was available only for one of the methylation positive ccRCC tumour samples and no methylation was detected.

## Discussion

HNF1B is a transcription factor from the homeobox-containing family of transcription factors, which is known predominantly for its role in the development of endoderm-derived organs, with a special importance in the development of kidneys<sup>35</sup>. However, there is emerging evidence that it may also play an important role in the carcinogenesis of several different types of solid tumours. In this context, *HNF1B* is a master regulator gene which exerts its influence through maintaining active transcription or counteracting the silencing effect induced by mitotic chromatin condensation<sup>36</sup>. While reports about the significance and specific pathogenetic role of HNF1B in tumorigenesis are often ambiguous, there is a consistent finding of positive HNF1B expression reported in association with tumours of clear cell phenotype, given that over 90% of these tumours show predominantly strong levels of HNF1B positivity on a protein level<sup>21, 37–40</sup>.

We have performed a comprehensive, multi-level analysis of the *HNF1B* gene on several of the most common kidney tumour subtypes. The mutation analysis did not reveal the presence of any somatic or germline class





**Figure 4.** Methylation of the *HNF1B* gene in kidney tumours from TCGA database. The visualized data of methylation analysis of all the CpG islands of *HNF1B* loci was downloaded through Mexpress (<https://mexpress.be>, accessed January 2020). Each row corresponds to tumour tissue sample, each column represents one of the 27 analysed CpG islands, the number above the column indicates the position of the CpG island from the transcription start site (TSS) of the *HNF1B* gene. Three of the CpG islands (in the blue box) were also included in our promoter region analysis.

3–5 mutations in *HNF1B*. This finding is consistent with the literature, which shows that while there are over 100 reported germline mutations which usually manifest themselves in the form of rare kidney developmental disorders<sup>40</sup> very little is known about somatic *HNF1B* mutations and their significance. However, there are a small number of case studies which state that *HNF1B*-renal disease is associated with a predisposition to chRCC development<sup>18,41</sup>.

In contrast to somatic *HNF1B* mutations, much more information is available about the significance of *HNF1B* SNPs and their association with either an increased or decreased risk of the development of several cancers. In our sample set of ccRCC, we analysed the relationship between the two most commonly implicated SNPs mentioned in literature (rs4430796 and rs757210) and their *HNF1B* expression, but no correlation was found. In our study, the key events in *HNF1B* alterations are therefore probably mediated either by different mechanisms, or by the effects of rarer SNPs, which have not been included in the analysis.

Epigenetic changes also play an important role in cancerogenesis as they influence gene expression and are frequently implicated in the development of cancer<sup>39</sup>. In mammalian cells, the most frequently occurring such alteration is DNA methylation, which is a reversible process and therefore represents a potential therapeutic target<sup>42</sup>. In our study, we found that promoter methylation was a rare event, only detected in 3 cases (2 ccRCCs, 1 RO), suggesting that there are other mechanisms aside from promoter methylation involved in the regulation of *HNF1B* expression. However, we were focused only on the CpG island area which correlates the most with *HNF1B* expression according to TCGA and literature<sup>33</sup>, so in order to fully discard the role of promoter methylation more inclusive analysis is needed. Our methylation results are in accordance with the data gained from TCGA, which shows methylation of the proximal promoter region in 2/480 of ccRCC, 1/321 papRCC and 0/66 chRCC ( $\beta$  value > 0.3 as a threshold for positive DNA methylation (Fig. 4)<sup>43</sup>.

In adult kidney parenchyma, a strong HNF1B nuclear expression is preserved in the tubular epithelia and the cells lining Bowmann's capsule, while the glomerular structures and surrounding stromal tissues are negative<sup>21</sup>. When evaluating the immunohistochemical expression of HNF1B in our sample sets, there were significant differences among some of the four studied tumour types.

The lowest HNF1B expression was observed in the subset of chRCC, where it was either significantly low [weak positivity in 2/11 cases (18%)], or more commonly completely absent [complete negativity in 9/11 cases (82%)]. However, these results are gained from a limited sample set and a more extensive analysis of a larger cohort is needed to better visualize the level of HNF1B expression downregulation. Nonetheless, very similar results were reported in the study by Szponar et al., who in their sample set of 21 chRCC did not observe any nuclear positivity at all<sup>23</sup>. Similarly, another study examined 18 chRCC and found HNF1B to be underexpressed in 16/18 (89%) cases<sup>44</sup>. On a molecular level, chRCC is characterised by a specific pattern of aneuploidy with the loss of entire copies of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, and especially 17 (where *HNF1B* is located)<sup>41</sup>. It has been reported that in a majority of chRCC there is a downregulation of HNF1B expression on both the mRNA and protein levels, and the same study observed a strong correlation between the reduced expression of HNF1B and aneuploidy in chRCC patients<sup>36</sup>. The authors also point to the role of additional loss of *TP53*, which may allow the cells to escape senescence and death. The combined *HNF1B* loss and *TP53* mutations increase cell proliferation and aneuploidy, promoting an aggressive phenotype in chRCC<sup>36</sup>. In the setting of chRCC, HNF1B may therefore have a tumour suppressive effect.

In our study, the highest expression of HNF1B was observed in the subset of papRCC followed by ccRCC, despite the striking differences in the hypothesized origin and pathogenesis of these two types of cancers.

On a molecular level, papRCC is characterised by specific trisomies and tetrasomies, especially of chromosome 7 and 17, with the genes *MET* (7q31) and *HNF1B* being particularly implicated in the pathogenesis of papRCC. The amplification and overexpression of *MET* has been linked to impaired differentiation of affected cells, which is then followed by copy number gain or amplification of chromosome 17, leading to an overexpression of HNF1B<sup>3,23</sup>. The resulting constitutive overexpression of HNF1B may further promote the proliferation of cells with delayed or arrested differentiation, which may be a part of the step-wise process of papRCC pathogenesis. Our results revealed that all the 17 papRCC showed some levels of HNF1B positivity, with most of the cases being strongly positive. Varying degrees of HNF1B positivity were also reported by Szponar et al., who observed strong nuclear HNF1B positivity in 38/67 (57%) papRCC in their sample set, as well as by Banyai et al., who observed a moderate IHC positivity in 47/76 (62%) of cases<sup>3,23</sup>. Given that HNF1B is consistently reported as being overexpressed in adult tumours of embryonal origins (papRCC, but also mucinous tubular spindle cell carcinoma and metanephric adenoma), this overexpression may be a driver of papRCC development. In papRCC, HNF1B may therefore function as a protooncogene.

Contrary to papRCC, in the case of ccRCC the tumour origin has been attributed to the epithelial cells lining the proximal tubule of the kidney nephron. In our subset of ccRCC we observed varying levels of nuclear expression in almost all the examined cases [91/93 (98%)], which is in keeping with the observation that HNF1B expression is preserved, but variably attenuated in tumour tissues compared to normal kidney<sup>45</sup>. Preserved HNF1B expression was also reported by Wang et al., who observed it in 23/24 (96%) cases of ccRCC in their study<sup>44</sup>. Contrary to those results, Szponar et al. reported that in their study only scattered nuclear positivity of HNF1B was observed in 7/98 (7%) ccRCC<sup>23</sup>. In our work, the expression was significantly correlated with the grade of the tumour, where a lower expression was associated with a higher grade.

The association between decreased HNF1B expression and malignant potential of ccRCC was also studied by Buchner et al., who examined the expression of HNF1B in ccRCC metastases on an mRNA level and found that the downregulation of HNF1B in ccRCC was associated with tumour progression and poor prognosis, suggesting that HNF1B might be a useful prognostic factor when stratifying patients with metastatic ccRCC into prognostic groups<sup>21</sup>. The authors hypothesize that the inactivation of HNF1B expression results in the deregulation of the transcriptional network, which leads to tumorigenesis and tumour progression. As such, the role of HNF1B in ccRCC could therefore be in the form of a tumour suppressor. However, more data is needed to confirm that hypothesis, especially given that this result is in stark contrast to the other most common tumour with a clear cell phenotype, OCCC, because in OCCC the overexpression of HNF1B is a common phenomenon and has been linked to the development of this tumour<sup>46</sup>.

These results highlight the different natural history between papRCC and ccRCC, considering that the mutations and molecular pathways involved in their development are different. In ccRCC, the significance of HNF1B is not only in its potential use as a prognostic factor, but its potential therapeutic role is also being discussed. Given that the role of HNF1B in the pathogenesis of ccRCC seems to lie in its inactivation, leading to an impaired transcription network, it is possible that the reactivation of HNF1B and its signalling role could restore the dysfunctional network<sup>21</sup>.

Regarding the IHC analysis, the difference in HNF1B expression between the subset of chRCC and RO may be of particular interest for routine diagnostic practice. RO is the second most frequent benign renal tumour of the renal parenchyma and represents 3–7% of all renal lesions<sup>47</sup>. Among others, morphologically it is characterised by eosinophilic features, which may resemble the eosinophilic subtype of chRCC and the distinction between these two entities can represent a diagnostic challenge<sup>48</sup>. Given that these are tumours with crucially different biological behaviours, proper diagnosis is key for correct postoperative surveillance and for the prognosis of the patient. In our study, following the post-hoc tests the difference in HNF1B expression did not reach statistical significance ( $p=0.080$ ). To date, no single, reliable immunohistochemical marker of oncocytoma and chRCC has been described. There are several studies which focused on the possible role of HNF1B in differentiating between RO and chRCC, however, they are often performed on small sample sets and report conflicting results<sup>23,44,49</sup>.

In order to maximize the therapeutic effects of any chosen treatment, individualized prognostic stratification of patients is needed. Currently, the established prognostic parameters for ccRCC include the tumour

histological type, pTNMG classification and the presence of necrosis and microscopic vascular invasion<sup>24</sup>. With the increasing use of targeted medicine, given its hypothesized different role in the development of different subtypes of RCC, the expression of HNF1B could potentially represent another prognostic factor enabling a better stratification of patients.

### Conclusion

RCC is comprised of a diverse spectrum of carcinoma subtypes with distinct morphology, molecular pathology, pathogenesis, and prognosis. Despite the advances in understanding the genetic aberrations behind the development of various RCC subtypes, the search for new prognostic markers, as well as potential therapeutic targets and differential diagnostic ancillary tests is constantly ongoing. HNF1B has already been well established as playing a crucial role in the development of the kidneys and as such could also be implicated in the pathogenesis of RCC. We have performed a comprehensive, multi-level analysis of HNF1B in several different kidney tumour types and found that the genetic and epigenetic analyses did not reveal any *HNF1B* mutations and only rare promoter methylation. The immunohistochemical analysis revealed that there are significant differences in HNF1B expression between the four studied tumour types. The different HNF1B expression suggests that in the setting of chRCC and ccRCC, HNF1B may be involved as a tumour suppressor, while in papRCC its role may be as a protooncogene. However, in order to determine the precise role of HNF1B in kidney tumour biology and its potential prognostic and therapeutic application, more studies on larger cohorts are needed.

### Data availability

The source data are included in this article and its supplementary information file or are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 30 March 2020; Accepted: 23 September 2020

Published online: 13 October 2020

### References

- Barbacci, E. *et al.* HNF1beta/TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 3139–3149. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh338> (2004).
- Kettunen, J. L. T. *et al.* Biliary anomalies in patients with HNF1B diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 2075–2082. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-00061> (2017).
- Banyai, D., Sarlos, D. P., Nagy, A. & Kovacs, G. Recalling Cohnheim's theory: papillary renal cell tumor as a model of tumorigenesis from impaired embryonal differentiation to malignant tumors in adults. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 784–790. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22489> (2018).
- Clissold, R. L. *et al.* Exocrine pancreatic dysfunction is common in hepatocyte nuclear factor 1beta-associated renal disease and can be symptomatic. *Clin. Kidney J.* **11**, 453–458. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfx150> (2018).
- Clissold, R. L., Hamilton, A. J., Hattersley, A. T., Ellard, S. & Bingham, C. HNF1B-associated renal and extra-renal disease—an expanding clinical spectrum. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 102–112. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.232> (2015).
- Okorn, C. *et al.* HNF1B nephropathy has a slow-progressive phenotype in childhood—with the exception of very early onset cases: results of the German Multicenter HNF1B Childhood Registry. *Pediatr. Nephrol.* **34**, 1065–1075. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4188-8> (2019).
- Omura, Y. *et al.* Clinical manifestations of a sporadic maturity-onset diabetes of the young (MODY) 5 with a whole deletion of HNF1B based on 17q12 microdeletion. *Endocr. J.* **66**, 1113–1116. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ19-0020> (2019).
- Alvelos, M. I. *et al.* A novel mutation of the HNF1B gene associated with hypoplastic glomerulocystic kidney disease and neonatal renal failure: a case report and mutation update. *Medicine* **94**, e469. <https://doi.org/10.1097/MD.000000000000469> (2015).
- Kato, N. & Motoyama, T. Hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in human urogenital organs: its expression and role in embryogenesis and tumorigenesis. *Histol. Histopathol.* **24**, 1479–1486. <https://doi.org/10.14670/HH-24.1479> (2009).
- Madariaga, L. *et al.* Variable phenotype in HNF1B mutations: extrarenal manifestations distinguish affected individuals from the population with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Clin. Kidney J.* **12**, 373–379. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfy102> (2019).
- Roehlen, N. *et al.* 17q12 deletion syndrome as a rare cause for diabetes mellitus type MODY5. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 3601–3610. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00955> (2018).
- Dubois-Laforgue, D. *et al.* Diabetes, associated clinical spectrum, long-term prognosis, and genotype/phenotype correlations in 201 adult patients with hepatocyte nuclear factor 1B (HNF1B) molecular defects. *Diabetes Care* **40**, 1436–1443. <https://doi.org/10.2337/dc16-2462> (2017).
- Stiles, C. E. *et al.* De novo HNF1 homeobox B mutation as a cause for chronic, treatment-resistant hypomagnesaemia. *Endocrinol. Diabetes Metab. Case Rep.* **1**, 5. <https://doi.org/10.1530/EDM-17-0120> (2018).
- Berndt, S. I. *et al.* Large-scale fine mapping of the HNF1B locus and prostate cancer risk. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3322–3329. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr213> (2011).
- Ross-Adams, H. *et al.* HNF1B variants associate with promoter methylation and regulate gene networks activated in prostate and ovarian cancer. *Oncotarget* **7**, 74734–74746. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12543> (2016).
- Painter, J. N. *et al.* Fine-mapping of the HNF1B multicancer locus identifies candidate variants that mediate endometrial cancer risk. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1478–1492. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu552> (2015).
- Setiawan, V. W. *et al.* HNF1B and endometrial cancer risk: results from the PAGE study. *PLoS ONE* **7**, e30390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030390> (2012).
- Rebouissou, S. *et al.* Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 603–614. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi057> (2005).
- Bartu, M. *et al.* The role of HNF1B in tumorigenesis of solid tumours: a review of current knowledge. *Folia Biol. (Praha)* **64**, 71–83 (2018).
- Matsui, A. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 1 beta induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition. *FEBS Lett.* **590**, 1211–1221. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12147> (2016).
- Buchner, A. *et al.* Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology* **76**(507), e506–511. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.03.042> (2010).
- Sun, M. *et al.* HNF1B loss exacerbates the development of chromophobe renal cell carcinomas. *Cancer Res.* **77**, 5313–5326. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0986> (2017).

23. Szponar, A., Yusenko, M. V., Kuiper, R., van Kessel, A. G. & Kovacs, G. Genomic profiling of papillary renal cell tumours identifies small regions of DNA alterations: a possible role of HNF1B in tumour development. *Histopathology* **58**, 934–943. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03795.x> (2011).
24. Escudier, B. *et al.* Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up dagger. *Ann. Oncol.* **30**, 706–720. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz056> (2019).
25. Turajlic, S., Swanton, C. & Boshoff, C. Kidney cancer: The next decade. *J. Exp. Med.* **215**, 2477–2479. <https://doi.org/10.1084/jem.20181617> (2018).
26. Courthod, G., Tucci, M., Di Maio, M. & Scagliotti, G. V. Papillary renal cell carcinoma: a review of the current therapeutic landscape. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **96**, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.008> (2015).
27. Gallardo, E. *et al.* SEOM clinical guideline for treatment of kidney cancer (2017). *Clin. Transl. Oncol.* **20**, 47–56. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1765-4> (2018).
28. Bartu, M. *et al.* Expression, epigenetic, and genetic changes of HNF1B in colorectal lesions: an analysis of 145 cases. *Pathol. Oncol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12253-020-00830-2> (2020).
29. Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E. & Ulbright, T. M. The 2016 WHO Classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur. Urol.* **70**, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029> (2016).
30. Hirsch, F. R. *et al.* Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3798–3807. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.069> (2003).
31. Gregova, M. *et al.* Leiomyoma with bizarre nuclei: a study of 108 cases focusing on clinicopathological features, morphology, and fumarate hydratase alterations. *Pathol. Oncol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00739-5> (2019).
32. Ticha, I. *et al.* A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci. Rep.* **9**, 17050. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53636-x> (2019).
33. Shen, H. *et al.* Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat. Commun.* **4**, 1628. <https://doi.org/10.1038/ncomms2629> (2013).
34. Wojdacz, T. K., Dobrovic, A. & Hansen, L. L. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat. Protoc.* **3**, 1903–1908. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.191> (2008).
35. Bockenbauer, D. & Jaureguiberry, G. HNF1B-associated clinical phenotypes: the kidney and beyond. *Pediatr. Nephrol.* **31**, 707–714. <https://doi.org/10.1007/s00467-015-3142-2> (2016).
36. Sun, J. *et al.* Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12. *Nat. Genet.* **40**, 1153–1155. <https://doi.org/10.1038/ng.214> (2008).
37. Kobel, M. *et al.* A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am. J. Surg. Pathol.* **33**, 14–21. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181788546> (2009).
38. Amano, Y. *et al.* Metabolic alterations caused by HNF1beta expression in ovarian clear cell carcinoma contribute to cell survival. *Oncotarget* **6**, 26002–26017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4692> (2015).
39. Cuff, J. *et al.* Integrative bioinformatics links HNF1B with clear cell carcinoma and tumor-associated thrombosis. *PLoS ONE* **8**, e74562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074562> (2013).
40. Nemejcova, K. *et al.* Expression, epigenetic and genetic changes of HNF1B in endometrial lesions. *Pathol. Oncol. Res.* **22**, 523–530. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-0037-2> (2016).
41. Lebrun, G. *et al.* Cystic kidney disease, chromophobe renal cell carcinoma and TCF2 (HNF1 beta) mutations. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **1**, 115–119. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0054> (2005).
42. Bubancova, I. *et al.* Next-generation sequencing approach in methylation analysis of HNF1B and GATA4 genes: searching for biomarkers in ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1. <https://doi.org/10.3390/ijms18020474> (2017).
43. Cancer Genome Atlas Research N. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell* **163**, 1011–1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.025> (2015).
44. Wang, C. C., Mao, T. L., Yang, W. C. & Jeng, Y. M. Underexpression of hepatocyte nuclear factor-1beta in chromophobe renal cell carcinoma. *Histopathology* **62**, 589–594. <https://doi.org/10.1111/his.12026> (2013).
45. Yu, D. D., Guo, S. W., Jing, Y. Y., Dong, Y. L. & Wei, L. X. A review on hepatocyte nuclear factor-1beta and tumor. *Cell Biosci.* **5**, 58. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0049-3> (2015).
46. Tsuchiya, A. *et al.* Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **163**, 2503–2512 (2003).
47. Akin, I. B. *et al.* Discrimination of oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma using MRI. *Diagn. Interv. Radiol.* **25**, 5–13. <https://doi.org/10.5152/dir.2018.18013> (2019).
48. von Brandenstein, M. *et al.* MicroRNAs as urinary biomarker for oncocytoma. *Dis Markers* **1**, 6979073. <https://doi.org/10.1155/2018/6979073> (2018).
49. Conner, J. R., Hirsch, M. S. & Jo, V. Y. HNF1beta and S100A1 are useful biomarkers for distinguishing renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma in FNA and core needle biopsies. *Cancer Cytopathol.* **123**, 298–305. <https://doi.org/10.1002/cncy.21530> (2015).

### Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Health, Czech Republic (Research project AZV 17-28404A and Conceptual development of research organization 64165, General University Hospital in Prague), by Charles University (Project Progress Q28/LF1 and SVV 260516), and by European Regional Development Fund (project EF16\_013/0001674, BBMRI\_CZ LM2018125, and OPVK—Research Laboratory of Tumor Diseases, CZ.2.16/3.1.00/24509). Special thanks belong to Zachary H.K. Kendall, B.A. for the English editing.

### Author contributions

Study concept and design: P.D., samples and clinical data collection: M.B., O.Č., M.Š., L.H., Q.H.B., L.K., preparation and analysis of samples: L.H., L.K., N.H., J.H., E.K., statistical analyses and data interpretation: R.M., I.S., M.B., K.N., drafting of the manuscript: M.B., J.H., N.H., I.S., P.D., R.M., proofread of the manuscript: I.S., P.D., K.N. All authors discussed the results, commented on the manuscript, and approved the final manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.


### Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74059-z>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.B. or P.D.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020