

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině
Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Jan Král

**Identifikace dědičných faktorů ovlivňujících vznik karcinomu pankreatu
a dalších solidních tumorů**

**Identification of hereditary factors influencing the formation of
a pancreatic carcinoma and other solid tumours**

Dizertační práce

Školitelka:

RNDr. Markéta Janatová, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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, 28.2.2023

Jan Král

Podpis

Identifikační záznam:

KRÁL, Jan. *Identifikace dědičných faktorů ovlivňujících vznik karcinomu pankreatu a dalších solidních tumorů. [Identification of hereditary factors influencing the formation of a pancreatic carcinoma and other solid tumours]*. Praha 2023. 100 s., 3 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Janatová, Markéta.

Poděkování:

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Markétě Janatové, Ph.D. za odborné vedení a celé Laboratoři onkogenetiky za příjemný a profesionální kolektiv. Zejména bych chtěl poděkovat Mgr. Zuzaně Volkové a Mgr. Sandře Jelínkové za dlouholeté přátelství a podporu.

Výzkum dědičných predispozic ke karcinomům pankreatu a endometria byl podpořen granty Ministerstva zdravotnictví (NU20-03-00285, RVO-VFN 64165, DRO-MMCI 00209805), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (BBMRI-CZ LM2018125, LM2018132, LX22NPO5102) a Univerzity Karlovy (GAUK902120). Práce byla rovněž podpořena institucionálními programy Univerzity Karlovy (SVV260516, PROGRES Q28/LF1, COOPERATIO).

Abstrakt

Karcinom pankreatu (PDAC) patří mezi nádorová onemocnění s jednou z nejhorších prognóz. Karcinom endometria (EC) je nejčastějším gynekologickým nádorovým onemocněním. Genetické pozadí u nádorových onemocnění je vysoce heterogenní a liší se mezi populacemi.

Vyšetřili jsme DNA 226 pacientů s PDAC a 527 pacientek s EC pomocí panelového sekvenování nové generace. Cílové geny jsme rozdělili na hlavní predispoziční geny (11 pro PDAC, 19 pro EC) a ostatní kandidátní geny. Pacientky s EC byly rozděleny do skupin na základě splnění indikačních kritérií k zárodečnému genetickému testování. Použili jsme dvě skupiny populačně specifických kontrol (kontroly bez nádorového onemocnění a populační kontroly).

Zárodečné patogenní varianty (PV) v hlavních predispozičních genech byly nalezeny u 18 (8,0 %) pacientů s PDAC. Nejčastěji mutovaným genem byl *BRCA2* (50 % nosičů). Signifikantně zvýšené riziko vzniku PDAC bylo u nosičů mutací v genech *BRCA1* (OR = 10,4; p = 0,04), *BRCA2* (OR = 6,4; p = 0,0009) a *CHEK2* (OR = 17,5; p = 0,003). Přítomnost mutace v genech podílejících se na procesech homologní rekombinace byla spojena s lepší dobou přežití pacientů. U pacientek s EC byly zárodečné PV v hlavních predispozičních genech nalezeny v 60 (11,4 %) případech. Nosičky mutací v genech Lynchova syndromu (LS) měly významně zvýšené riziko EC (OR = 22,4; p = $1,8 \times 10^{-17}$). Další geny asociované se zvýšeným rizikem vzniku EC byly *BRCA1* (OR = 3,9; p = 0,001), *BRCA2* (OR = 7,4; p = 0,002) a *CHEK2* (OR = 3,2; p = 0,04). Nosičky mutací v LS genech měly nižší věk diagnózy EC než pacientky bez mutace (51,0 vs. 61,4 let, p = 0,01). 28,3 % nosiček PV v klinicky relevantních genech nebylo zachyceno současnými indikačními kritérii ke genetickému testování.

Výsledky této práce ukazují význam genetického testování pacientů s nádorovými onemocněními.

Klíčová slova: hereditární nádorová predispozice, duktální adenokarcinom pankreatu, karcinom endometria, sekvenování nové generace, panelové sekvenování, zárodečné mutace

Abstract

Pancreatic adenocarcinoma (PDAC) has one of the worst prognoses out of all cancers worldwide. Endometrial carcinoma (EC) is the most common gynecological cancer. Genetic background of tumors is highly heterogenous and differs among populations.

We have analyzed DNA of 226 PDAC patients and 527 EC patients using panel next-generation sequencing. Targeted genes were divided into main predisposition genes (11 for PDAC, 19 for EC) and other candidate genes. EC patients were categorized based on meeting the indication criteria for germline genetic testing. Two sets of population-matched controls were used (controls with negative cancer history, and general population controls).

Germline pathogenic variants (PV) in main predisposition genes were identified in 18 (8.0%) PDAC patients. The most mutated gene was *BRCA2* (50% of carriers). PDAC risk was significantly elevated in carriers of PV in *BRCA1* (OR = 10.4, $p = 0.04$), *BRCA2* (OR = 6.4, $p = 0.0009$), and *CHEK2* (OR = 17.5, $p = 0.003$). Germline mutations in genes participating in homologous recombination processes were associated with improved overall survival of patients. Among EC patients there were 60 (11.4%) carriers of PV in main predisposition genes. Carriers of PV in Lynch syndrome (LS) genes had markedly elevated risk of developing EC (OR = 22.4, $p = 1.8 \times 10^{-17}$). Other genes associated with higher EC risk were *BRCA1* (OR = 3.9, $p = 0.001$), *BRCA2* (OR = 7.4, $p = 0.002$), and *CHEK2* (OR = 3.2, $p = 0.04$). Carriers of LS gene mutations had lower age of EC onset than non-carriers (51.0 vs. 61.4 years, $p = 0,01$). 28.3 % of PV carriers in clinically relevant genes did not meet any indication criteria for germline genetic testing.

The results of this thesis emphasize the importance of genetic testing of patients suffering from oncological disease.

Key words: hereditary predisposition to cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma, endometrial cancer, next-generation sequencing, panel sequencing, germline mutation

Obsah

1.	Teoretický úvod	3
1.1.	Nádorová onemocnění	3
1.2.	Opravy poškození DNA	7
1.2.1.	Přímá oprava bází	7
1.2.2.	Base excision repair	8
1.2.3.	Nucleotide excision repair	8
1.2.4.	Oprava chybně spárovaných bází	9
1.2.5.	Opravy dvouřetězcových zlomů	10
1.3.	Dědičná nádorová onemocnění	12
1.4.	Karcinom pankreatu	14
1.4.1.	Epidemiologie karcinomu pankreatu	14
1.4.2.	Patogeneze karcinomu pankreatu	17
1.4.3.	Dědičné predispozice ke karcinomu pankreatu	19
1.5.	Karcinom endometria	26
1.5.1.	Epidemiologie karcinomu endometria	26
1.5.2.	Patogeneze a klasifikace karcinomu endometria	28
1.5.3.	Dědičné predispozice ke karcinomu endometria	32
2.	Cíle práce	36
3.	Metody	37
3.1.	Soubor testovaných pacientů a kontrol	37
3.1.1.	Soubor pacientů s PDAC	37
3.1.2.	Soubor pacientů s EC	38
3.1.3.	Soubor kontrol	41
3.2.	Izolace DNA z periferní krve	41
3.3.	Sekvenování nové generace	41
3.3.1.	Sekvenační panel CZECANCA	41
3.3.2.	Příprava NGS knihovny	42
3.3.3.	Kontrola nabohacení	47
3.3.4.	Illumina sekvenování	49
3.4.	Bioinformatické zpracování	51
3.5.	Analýza dat	51
3.5.1.	Skupiny genů – karcinom pankreatu	51

3.5.2.	Skupiny genů – karcinom endometria	51
3.5.3.	Prioritizace variant.....	52
3.5.4.	Statistické zpracování	52
3.6.	Potvrzení přítomností genetických variant.....	53
3.6.1.	Sangerovo sekvenování	53
3.6.2.	MLPA	54
4.	Výsledky	55
4.1.	Vyšetření pacientů s karcinomem pankreatu.....	55
4.1.1.	Patogenní varianty v predispozičních genech	55
4.1.2.	Klinicko-patologické charakteristiky nosičů mutací	57
4.2.	Vyšetření pacientek s karcinomem endometria.....	59
4.2.1.	Patogenní varianty v 19 hlavních EC predispozičních genech.....	60
4.2.2.	Mutace v 207 kandidátních predispozičních genech.....	62
4.2.3.	Klinicko-patologická charakteristika nosičů mutací	64
5.	Diskuze.....	68
5.1.	Karcinom pankreatu	68
5.2.	Karcinom endometria	72
6.	Závěr	77
6.1.	Karcinom pankreatu	77
6.2.	Karcinom endometria	77
7.	Seznam použitých zkratk	78
8.	Seznam použité literatury.....	80
	Přílohy	101

1. Teoretický úvod

1.1. Nádorová onemocnění

Maligní nádory jsou genetická onemocnění charakterizovaná zejména svým nekontrolovatelným růstem napříč okolními tkáněmi. Nádorová onemocnění tak činí bez ohledu na výstavbový plán těla, v rámci něhož jsou jednotlivé buňky organismu organizovány do funkčních celků (tkání, orgánů, orgánových soustav). Dodržení výstavbového plánu je za běžných okolností zajištěno pomocí komplexní buněčné signalizace, a to jak na lokální mezibuněčné úrovni, tak celotělové úrovni pomocí hormonální regulace (Novotny *et al.*, 2019). Samotné buňky tkání a orgánů jsou udržovány v dynamické rovnováze mezi tvorbou nových buněk a zánikem buněk starých (senescentních) či poškozených. Tato dynamická rovnováha se nazývá tkáňová homeostáza. Maligní nádorová onemocnění vznikají, je-li tkáňová homeostáza porušena ve prospěch přežívání a růstu (Novotny *et al.*, 2019).

Aby buňka organismu prošla přeměnou v maligní nádorovou buňku, neboli aby prošla maligní transformací, musí u ní dojít k selhání kontrolních mechanismů tkáňové homeostázy. Mezi takovéto mechanismy patří regulace průběhu buněčného cyklu, limit celkového množství mitóz, kterými může buňka procházet, nebo indukce buněčné smrti (apoptózy). Selhání zmíněných kontrolních mechanismů je výsledkem porušení funkce zúčastněných proteinů, typicky na základě změn v genech, které je kódují (Foretova *et al.*, 2022). Za iniciací maligní transformace buňky tak stojí postupná akumulace somatických (v průběhu života získaných) mutací v buněčném genomu. V případě hereditárních nádorových onemocnění k maligní transformaci přispívají i mutace zděděné. Mutace mohou mít jak charakter záměny jednoho nukleotidu DNA nebo krátkých inzercí/delecí, tak i velkých genomových přestaveb. Pro maligní transformaci jsou klíčová poškození funkce dvou hlavních skupin genů: protoonkogenů, které kódují proteiny pozitivně ovlivňující buněčný růst a přežívání, a tumor supresorových genů, které působí proti účinku protoonkogenů, limitují tedy buněčné dělení, indukují apoptózu, případně rozpoznávají poškození DNA a opravují je (Novotny *et al.*, 2019).

Aby se protoonkogen změnil v onkogen a začal přispívat k procesu maligní transformace, je u něho nutná aktivační mutace jedné jeho alely (Torry and Cooper, 1991). Mutace v protoonkogenech tedy mají dominantní charakter. Zárodečné mutace

v protoonkogenech se téměř nevyskytují, jelikož aktivovaný onkogen je přítomen ve všech buňkách organismu od jeho zrodu (výjimkou jsou hereditární mutace v genech tyrosinkinázových receptorů RET, MET a KIT) (Tovar and Graveel, 2017).

Aby tumor supresorový gen začal přispívat k maligní transformaci, je u něho potřeba inaktivační mutace obou alel. Tento proces je známý jako Knudsonova teorie dvou zásahů (Knudson, 1971). Mutace v tumor supresorových genech se tedy na buněčné úrovni chovají recesivně. Naprostá většina dědičných mutací predisponujících k nádorovým onemocněním se tak nachází právě v tumor supresorových genech.

V roce 1997 Kinzler a Vogelstein navrhli dvě kategorie tumor supresorových genů podle jejich funkce (Kinzler and Vogelstein, 1997). První jsou tzv. gatekeeper geny (někdy překládány jako strážné geny), které se přímo účastní regulace proliferace. Typickými příklady takovýchto genů jsou *TP53* nebo *RBI*. Inaktivace obou alel gatekeeper genů přispívá přímo ke ztrátě kontroly nad buněčným dělením a k maligní transformaci. V případě přítomnosti zárodečné mutace jedné alely stačí somatická inaktivace druhé, zpravidla epigeneticky nebo v rámci velké přestavby. K nádorovému onemocnění tak dochází velice brzy v životě nosiče mutace, typicky již během dětství (dědičný retinoblastom, Liův-Fraumeniho syndrom). Riziko vzniku nádorů pro nosiče zárodečných mutací v těchto genech je mnohonásobně zvýšeno (10-100×) (Foretova *et al.*, 2022). Gatekeeper geny a jejich role v maligní transformaci odpovídají Knudsonově teorii dvou zásahů. Oproti gatekeeper genům stojí caretaker geny (někdy překládány jako správcovské), které zodpovídají za integritu a stabilitu genomu. Typickými příklady caretaker genů jsou geny, jejichž proteinové produkty se účastní DNA opravných drah. Inaktivace obou alel caretaker genu nepřispívá přímo k maligní transformaci, ale zvyšuje šanci budoucího poškození jiného genu, ať už protoonkogenu, nebo gatekeeper tumor supresorového genu. Nosiči zárodečných mutací v caretaker genech vyvíjejí nádorové onemocnění až v dospělosti (Foretova *et al.*, 2022).

Mutace genomu lze rovněž rozdělit na tzv. „driver“ mutace, tedy mutace aktivně podporující kancerogenezi, a „passenger“ mutace, které vznikají díky zvýšené nestabilitě genomu, ale nemají přímý vliv na přežívání nádorové tkáně (Vogelstein and Kinzler, 2015).

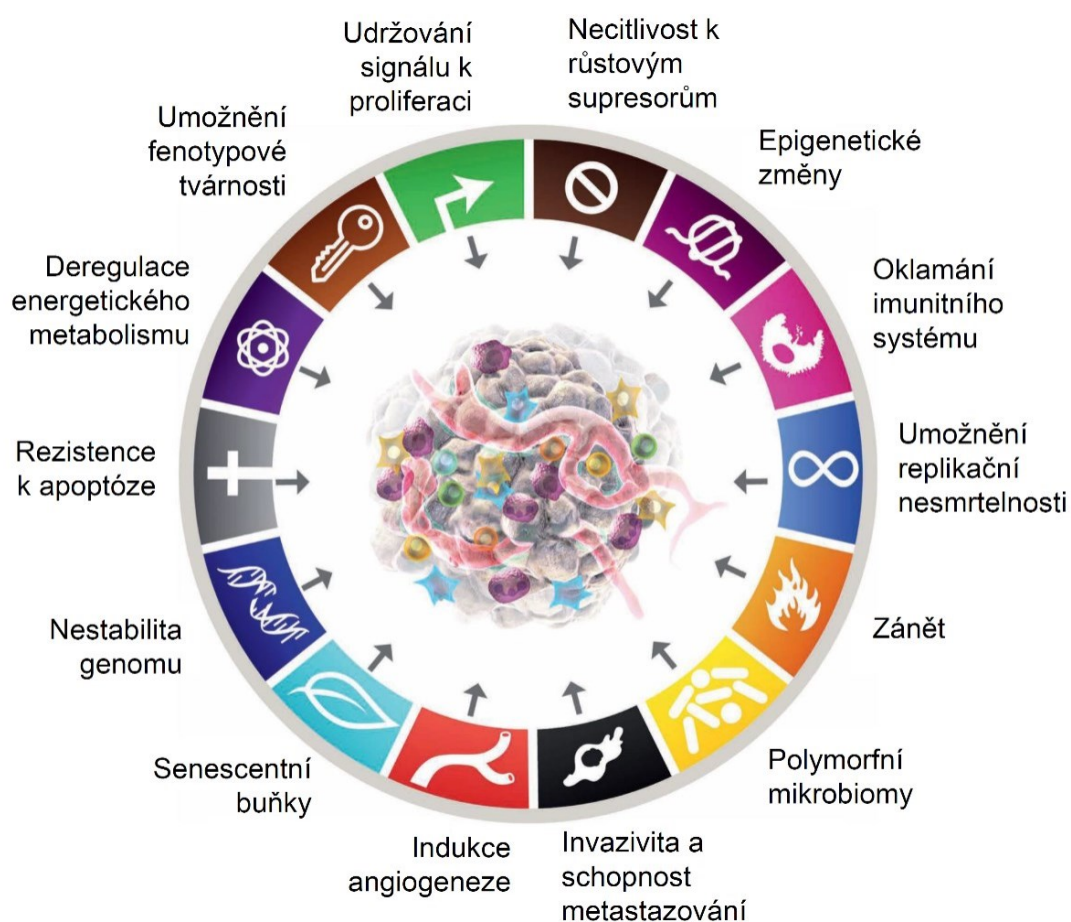
Aby mohlo dojít k transformaci běžné buňky organismu v buňku maligního nádoru, musí tato buňka postupně překonat jednotlivé bariéry kontrolních mechanismů a získat tak charakteristické rysy nádorové buňky, takzvané „hallmarks of cancer“. Tyto typické rysy

poprvé shrnuli Hanahan a Weinberg v roce 2000 a postupně je v dalších dvou publikacích doplňovali o nové poznatky až do celkového počtu 14 rysů (Hanahan and Weinberg, 2000, Hanahan and Weinberg, 2011, Hanahan, 2022). Přehled všech 14 charakteristických rysů je na obrázku 1.

Mezi prvních šest charakteristický rysů, definovaných již v roce 2000, patří udržování signálu k proliferaci buňky. Pravděpodobně jeden z nejtypičtějších projevů nádorového onemocnění je právě jeho růst. Nádorová buňka si ho zajišťuje úpravou vnitrobuněčných signálních kaskád, ať už tvorbou vlastních růstových faktorů, zvýšením množství odpovídajících povrchových receptorů nebo modifikací signální dráhy, aby neustával signál k dělení. S udržováním signálu k proliferaci souvisí i necitlivost k růstovým supresorům. Jedná se o obejití kontrolních bodů buněčného cyklu, jako je například kontrola integrity DNA. Typickým projevem maligního nádoru je rovněž rezistence k apoptóze – mechanismu vedoucímu k sebedestrukci buňky. Běžná buňka organismu je omezena v počtu buněčných dělení, které může za svůj život podstoupit (tzv. Hayflickův limit). Důležitou vlastností nádorové buňky je tedy překonání této přirozené bariéry za dosažení replikační nesmrtnosti. Nádorová tkáň podobně jako běžná tkáň vyžaduje přísun živin a kyslíku, stejně jako odbytiště pro odpadní látky. Pro nádor je tak nezbytné získat schopnost indukovat angiogenezi, neboli tvorbu nových krevních cév. Jako poslední z původních šesti typických rysů nádorového onemocnění je schopnost invaze do tkání v bezprostředním okolí i do tkání vzdálených (metastaze) (Hanahan and Weinberg, 2000).

V roce 2011 doplnili Hanahan a Weinberg seznam „hallmarks of cancer“ o další dva charakteristické rysy a dva podpůrné rysy, které umožňují vznik ostatních. Mezi dva nové rysy patří deregulace energetického metabolismu, během něhož nádorová tkáň využívá pro zisk energie výhradně anaerobní glykolýzu (tzv. Warburgův jev). Druhým rysem je oklamání imunitního systému, který je jinak schopný identifikovat nádorové buňky a eliminovat je. Mezi dva podpůrné mechanismy patří chronický zánět, který je sice projevem imunitního systému, ale paradoxně může přispívat k maligní transformaci, zejména díky zvýšené koncentraci růstových a proangiogenních faktorů v místě zánětu. Druhým podpůrným faktorem je nestabilita genomu, charakterizovaná špatnou funkcí DNA reparačních drah, čímž je umožněno hromadění somatických genetických variant, které by za běžných podmínek byly rozpoznány a opraveny (Hanahan and Weinberg, 2011).

V roce 2022 rozšířil Hanahan seznam „hallmarks“ o další čtyři rysy. Popisuje například, že vznikající nádorová buňka může pomocí získané schopnosti fenotypové tvárnosti procházet dediferenciací do jinak nepřístupné formy progenitorových buněk. Hanahan rovněž upozorňuje na roli, kterou hraje mikrobiom jednak obecně na zdraví a reakci na onemocnění, ale i na ovlivňování maligní transformace. Mikrobiom může nádorová onemocnění ovlivňovat jak pozitivně, tak negativně, a to působením růstovými faktory, zánětem, případně rezistencí k terapii. Dalším rysem přispívajícím ke vzniku nádorů jsou epigenetické změny. V reakci na okolní prostředí (např. hypoxii) může epigenetickými mechanismy dojít ke změně fenotypu buňky, který přispívá ke vzniku nádorového onemocnění. Jako poslední je zmíněna role senescentních buněk v nádorové transformaci. Senescence je proces, během něhož buňka nevratně přechází do stavu, kdy se již nemůže dále dělit. Představuje tak obranný mechanismus proti maligní transformaci. Samotné senescentní buňky ovšem sekretují molekuly (chemokiny, cytokiny), které mohou přispívat k tvorbě nádorů (Hanahan, 2022).



Obrázek 1. Přehled charakteristických rysů maligního nádorového onemocnění. Převzato a upraveno z (Hanahan, 2022).

1.2. Opravy poškození DNA

Nádorová onemocnění jsou způsobena poškozením a modifikací genomové DNA. K takovým poškozením dochází působením řady faktorů endogenního a exogenního původu. Mezi endogenní poškození patří například chyby během replikace, spontánní deaminace bází, spontánní hydrolýza N-glykosidové vazby mezi deoxyribózou a dusíkatou bází za tvorby abazického místa či působení endogenních reaktivních forem kyslíku. Časté jsou rovněž poruchy vzniklé špatnou funkcí DNA topoizomeráz nebo replikační vidlice. Mezi exogenní genotoxické vlivy pak můžeme řadit různé formy záření (UV záření, ionizující záření), chemické kancerogeny (polycyklické aromatické uhlovodíky, azbest), nebo i biologické faktory (onkogenní viry) (Chatterjee and Walker, 2017).

Protože pro správnou funkci buňky je nezbytná správná struktura a neporušenost DNA, vyvinula se řada reparačních mechanismů, které mají za cíl nacházet specifické druhy poškození DNA a opravovat je. Mezi tyto DNA reparační dráhy patří mechanismy, které mají za cíl odstranit jednoduché kovalentní modifikace bází (přímé opravy), mechanismy opravující komplexnější poškození nukleotidů, jednořetězcové zlomy (excizní reparace, oprava chybně spárovaných bází) a závažné dvouřetězcové zlomy (nehomologní spojování volných konců, homologní rekombinace) (Wright *et al.*, 2018, Fishel, 2015).

Zasažení funkce DNA reparačních proteinů tak umožňuje hromadění somatických mutací, které mohou vést k maligní transformaci buňky.

1.2.1. Přímá oprava bází

Přímá oprava bází spočívá v opravách aduktů bází, aniž by bylo zasaženo do samotné struktury DNA řetězce. Jsou známy dvě různé třídy enzymů provádějící přímou opravu bází. První z nich je O⁶-alkylguanin-DNA-alkyltransferáza (AGT/MGMT), která opravuje O-alkylaci bází. Typickou formou alkylace je O⁶-methylace, ethylace nebo 2-chloroethylace. MGMT je transferáza, která odstraní alkylový zbytek z kyslíku báze (typicky guaninu) na cysteinový zbytek v katalytickém místě (Kaina *et al.*, 2007).

Druhou třídou enzymů přímé opravy bází představuje AlkB dioxygenáza, která opravuje N-alkylové adukty. AlkB odstraňuje methylový zbytek jeho hydroxylací, což je

proces závislý na přítomnosti α -ketoglutarátu a $\text{Fe}^{\text{III}+}$ kationtu. Oxidovaný methyl je následně uvolněn ve formě formaldehydu (Chatterjee and Walker, 2017, Falnes *et al.*, 2007).

1.2.2. Base excision repair

Base excision repair (BER) opravuje oxidační, deaminační a alkylační poškození bází, stejně jako abazická místa vzniklá spontánní hydrolyzou N-glykosidové vazby. BER nastává v případech, kdy nemá poškození bází výrazný vliv na strukturu dvoušroubovice DNA. Probíhá zejména během G1 fáze buněčného cyklu a začíná rozpoznáním místa poškození DNA glykosylázou (např. MUTYH). Glykosyláza vyštěpí poškozenou dusíkatou bázi, čímž vzniká abazické místo. Abazické místo může být opraveno dvěma různými drahami – krátkou dráhou nebo dlouhou dráhou BER (Chatterjee and Walker, 2017).

Krátká dráha BER využívá štěpení 5' konce abazického místa za tvorby jednořetězcového zlomu. Na místo zlomu přichází DNA polymeráza β , která svou lyázovou aktivitou odstraňuje přebytečný deoxyribózafosfát a následně zaplňuje vzniklou jednonukleotidovou mezeru. Řetězce DNA jsou spojeny DNA ligázou (Almeida and Sobol, 2007).

Dlouhá dráha BER začíná rovněž štěpením 5' konce abazického místa. DNA polymeráza β tentokrát ale nevyplní jen jednonukleotidovou mezeru, ale syntetizuje delší řetězec, kterým vytlačuje vlákno DNA s abazickým místem. Toto staré vlákno DNA je odštěpeno DNA endonukleázou a opravené řetězce jsou spojeny DNA ligázou (Chatterjee and Walker, 2017, Svilar *et al.*, 2011).

Zárodečné mutace v genu *MUTYH* je spojeny s autosomálně recesivním syndromem adenomatózní polypózy a kolorektálního karcinomu. (Win *et al.*, 2014)

1.2.3. Nucleotide excision repair

Nucleotide excision repair (NER) se využívá při poškození, které výrazně narušuje strukturu DNA dvoušroubovice. Mezi taková poškození patří například produkty UV záření (cyklobutanové dimery pyrimidinů) nebo adukty chemických kancerogenů (např. benzo(a)pyrenu). Průběh NER je odlišný v závislosti na tom, zda je postižená oblast transkripčně aktivní (transcription-coupled NER, TC-NER) nebo transkripčně neaktivní (global genome NER, GG-NER). Tyto dvě dráhy se liší zejména ve fázi detekce poškození

DNA, zatímco kroky vyštěpení defektu, dosyntetizování DNA a následné ligace jsou společné (Scharer, 2013).

GG-NER využívá sensorového proteinu XPC, který se nachází v komplexu s dvěma proteiny. Jakmile se XPC naváže na místo poškození, je rozpoznáno transkripčním faktorem TFIIH, obsahujícím DNA helikázu XPD, které rozvolní strukturu dvoušroubovice DNA. Vyštěpení defektní oblasti je prováděno strukturně specifickými endonukleázami, které vyštěpí úsek 24-32 bp obsahující poškozené báze. Vzniklá mezera je zaplněna DNA polymerázami δ/ϵ a řetězce jsou spojeny DNA ligázami (Chatterjee and Walker, 2017).

Dráha TC-NER je zahájena zastavením RNA polymerázy II v místě defektu DNA. Toto místo je díky tomu rozpoznáno sensorovými proteiny CSA a CSB, které odsunují RNA polymerázu II a tím uvolňují prostor pro následnou opravu, která probíhá shodně s GG-NER (Marteijn *et al.*, 2014).

Ztráta exprese nebo poškození funkce některých proteinů NER dráhy jsou spojeny s autosomálně recesivními syndromy: Cockaynův syndrom (porucha CSA, CSB), Xeroderma pigmentosum (XPA-G) (Natale and Raquer, 2017).

1.2.4. Oprava chybně spárovaných bází

Oprava špatného spárování bází (mismatch repair, MMR) slouží k opravě chyb DNA polymerázy během replikace. Samotná DNA polymeráza je díky své exonukleázové aktivitě velice přesný enzym, který má frekvenci chybovosti přibližně 1 na 10^9 až 10^{10} párů bází na buněčné dělení. Aktivita MMR systému zvyšuje tuto přesnost až 1000×. Poškození funkce MMR tak má za následek značně zvýšené množství mutací genomu (Hsieh and Yamane, 2008).

MMR systém opravuje chybně spárované báze, případně malé inserce a delece. Detekce různých druhů změn probíhá různě. Zatímco chybné spárování bází je identifikováno heterodimerem MutS α (složeným z proteinů MSH2 a MSH6), krátké inserce a delece jsou rozpoznány heterodimerem MutS β (složeným z proteinů MSH2 a MSH3). Po nasednutí na místo změny dimery MutS α /MutS β interagují s heterodimerem MutL α (složeným z proteinů MLH1 a PMS2) (Baretti and Le, 2018). MutL α má endonukleázovou aktivitu, kterou využívá k vytvoření jednořetězcového zlomu na nově vzniklém vlákně DNA. Místo zlomu je následně rozpoznáno exonukleázou EXO1, která degraduje část

řetězce DNA s chybou. Vzniklá mezera je zaplněna DNA polymerázou δ nebo ϵ a volné konce jsou spojeny DNA ligázou.

Deficience v MMR opravné dráze je spojena se syndromem hereditárního karcinomu kolorekta, známého také jako Lynchův syndrom (LS) (viz kapitola 1.4.3.4) (Lynch *et al.*, 1988). Typickým ukazatelem špatné funkce MMR dráhy je mikrosatelitová nestabilita (MSI). Ta vzniká v repetitivních oblastech (opakování motivů jednoho až šesti nukleotidů), které jsou náchylné na chybu DNA polymerázy. V nádorové tkáni je pak možné pomocí PCR detekovat různé dlouhé sekvence mikrosatelitů, odlišující se od germinálních sekvencí okolní tkáně (De' Angelis *et al.*, 2018).

1.2.5. Opravy dvouřetězcových zlomů

Zlomy obou řetězců DNA patří mezi nejzávažnější poškození genomu. Mohou vznikat buď působením řady exogenních genotoxických vlivů, nebo i endogenními pochody, kdy jednořetězcový zlom přechází během replikace DNA ve dvouřetězcový (Pfeiffer *et al.*, 2000). Opravy dvouřetězcových zlomů probíhají dvěma základními způsoby: nehomologním spojováním volných konců DNA nebo homologní rekombinací.

1.2.5.1. Nehomologní spojování konců

Nehomologní spojování volných konců DNA (NHEJ) představuje hlavní způsob opravy dvouřetězcových zlomů. Jedná se o rychlý, ale chybový proces, který je využíván zejména v G0 a G1 fázích buněčného cyklu. NHEJ probíhá ve dvou hlavních formách, které se odlišují zejména způsobem úpravy konců přerušené DNA. Kanonická cesta NHEJ je zahájena působením DNA proteinkinázy (DNA-PK) a zahrnuje jen malé úpravy konců vláken. Oproti tomu dráha alternativní NHEJ může způsobovat výrazná poškození DNA (Chang *et al.*, 2017).

Během kanonické dráhy NHEJ je místo dvouřetězcového zlomu rozpoznáno heterodimerem Ku70/Ku80, který se na místo zlomu váže. Slouží jako strukturální prvek pro další složky NHEJ. Na Ku70/Ku80 nasedá DNA-PK, která fosforyluje histon H2AX. Fosforylovaný H2AX je typickým poznávacím znamením dvouřetězcového zlomu a je nezbytný pro zahájení jeho opravy. Na fosforylovaný H2AX přichází exonukleáza DCLRE1C, která upravuje konce DNA. Vzniklé mezery jsou doplněny DNA polymerázami μ a λ a vytvořené řetězce jsou spojeny DNA ligázou (Chatterjee and Walker, 2017).

1.2.5.2. Homologní rekombinace

Dráha homologní rekombinace (HR) umožňuje velice přesnou opravu dvouřetězcových zlomů DNA, a to díky využití homologního úseku sesterské chromatidy coby templátu pro syntézu nového vlákna v postiženém místě. HR tak může probíhat pouze v S a G2 fázi buněčného cyklu, kdy je sesterská chromatida k dispozici.

HR je zahájeno trimerním MRN komplexem, složeným z exonukleázy MRE11, RAD50 a NBN. MRN komplex rozpoznává místo zlomu a váže se na něj. Na MRN se následně váže ATM, který fosforyluje histon H2AX. Na fosforylovaný a následně ubikvitinovaný histon H2AX nasedá BRCA1 a BRIP1, který aktivuje DNA exonukleázu (Chatterjee and Walker, 2017). Počáteční resekce DNA a následující rozsáhlé resekce (stovky kb) jsou prováděny různými DNA nukleázami. Vzniklá jednovláknová DNA je obalena RPA proteiny, aby nevznikaly sekundární struktury. RPA proteiny jsou následně nahrazeny rekombinázou RAD51. RAD51 za pomoci BRCA2 a PALB2 vytváří nukleoproteinovou filamentární strukturu, která přenáší přerušovaný řetězec DNA do oblasti homologního úseku na sesterské chromatidě. Syntéza vlákna DNA podle templátu sesterské chromatidy je prováděna například DNA polymerázou δ (Wright *et al.*, 2018).

S přispěním proteinů HR dráhy probíhá také oprava kovalentních spojů mezi řetězci DNA. Tato poškození brání průběhu replikace a transkripce. Na jejich rozpoznání a opravě se podílejí geny Fanconiho anemie (FA), jejichž proteinové produkty vytvářejí rozsáhlý aktivační komplex. Oblast meziřetězcového spoje je detekována proteiny FANCM a FAAP24, které iniciují tvorbu centrálního komplexu (FANCA/B/C/E/F/G/FAAP100). Centrální komplex za asistence ubikvitinligázy FANCL ubikvitinuje heterodimer FANCI/FANCD2, který následně aktivuje enzymy SLX4 (FANCP), XPF (FANCQ) a další proteiny, které se účastní i HR dráhy: BRIP1 (FANCJ), PALB2 (FANCN), BRCA2 (FANCD1), BRCA1 (FANCS), RAD51C (FANCO) (D'Andrea and Grompe, 2003).

Heterozygotní zárodečné mutace v genech HR dráhy jsou spojeny zejména s hereditárním karcinomem prsu a ovaria (HBOC; například *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*) (Claes *et al.*, 2004, Peterlongo *et al.*, 2011). Homozygotní inaktivace genu *ATM* vede k onemocnění ataxia telangiectasia (Rothblum-Oviatt *et al.*, 2016). Homozygotní zárodečné mutace v genech účastnících se oprav meziřetězcových spojů, mezi něž mimo jiné patří i zmíněné geny *BRCA1/2* a *PALB2*, způsobují onemocnění FA (Nalepa and Clapp, 2018).

1.3. Dědičná nádorová onemocnění

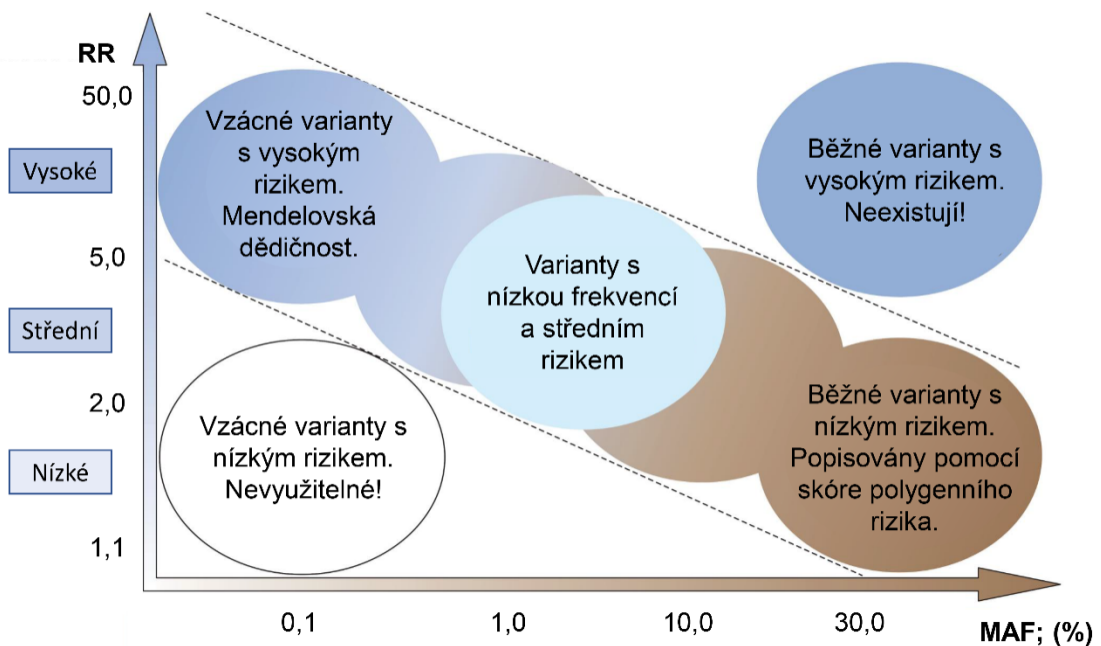
Nádorová onemocnění vznikají postupnou akumulací somatických variant v genomu buňky. Přibližně 90-95 % všech nádorových onemocnění je podmíněno kauzálními mutacemi, které vznikly během života jedince. V takovém případě hovoříme o sporadických nádorových onemocněních. Nicméně, ve zbylých 5-10 % případů je vznik nádorového onemocnění podmíněn zděděnou, zárodečnou mutací. Takovéto zárodečné mutace mohou výrazně predisponovat jejich nosiče ke vzniku nádorového onemocnění a mohou být příčinou dědičných nádorových syndromů. Charakteristickým znakem dědičných nádorových syndromů je častý výskyt určitého typu nádorového onemocnění v rodině, brzký výskyt onemocnění u nosiče mutace a typicky i vznik vícečetných primárních malignit u nosiče (Foretova *et al.*, 2022).

Dědičná složka nádorových onemocnění se obecně udává jako zmíněných 5-10 %, nicméně pro konkrétní nádorová onemocnění může nabývat vyšších či nižších hodnot. Například u karcinomu plic tvoří dědičná forma onemocnění 3 %, kdežto u karcinomu ovaria až 25 % (Novotny *et al.*, 2019, Lhotova *et al.*, 2020).

Nádorové syndromy jsou fenotypově heterogenním onemocněním. Zárodečné mutace v mnoha různých genech mohou mít za následek podobné projevy (typicky HBOC), stejně tak se ale zárodečná mutace v jednom genu může projevovat v rámci zdánlivě odlišných syndromů (kupříkladu role genu *BRCA2* v predispozici jak ke karcinomu prsu, tak třeba karcinomu pankreatu) (Foretova *et al.*, 2022).

Pravděpodobnost, že se u nosiče mutace projeví odpovídající nádorové onemocnění, se označuje jako penetrance. Pokud se onemocnění projeví u všech nosičů, jedná se o penetranci úplnou. Taková penetrance je ale u dědičných nádorových onemocnění spíše vzácná. Většina dědičných nádorových onemocnění tak má penetranci neúplnou (Foretova *et al.*, 2022). Riziko vzniku nádoru se buď popisuje jako kumulativní riziko, ať už celoživotní či k určitému věku (udáváno v procentech), nebo se popisuje jako relativní riziko (RR), které říká, jakou míru rizika vzniku onemocnění má nosič mutace oproti běžné populaci. Zárodečné varianty, které s sebou nesou $RR < 2$, jsou označovány jako varianty s nízkým rizikem. Varianty, které mají RR vzniku nádorového onemocnění ≥ 2 a < 5 , jsou variantami se středním rizikem a genetické varianty s $RR \geq 5$ jsou vysoce rizikové varianty (Foulkes, 2008). Závislost RR na frekvenci mutací je vyobrazena na obrázku 2.

Pokud pro projev nádorové onemocnění stačí zárodečná mutace v pouze jedné alele, hovoříme o dominantním nádorovém syndromu. Typickým příkladem takového syndromu jsou například HBOC nebo LS (kapitoly 1.4.3.3 a 1.4.3.4). Je-li pro projev nádorového onemocnění nutné zdědit zárodečnou mutaci v obou alelách genu, jedná se o recesivní nádorový syndrom. Příkladem recesivního nádorového syndromu je FA (Foretova *et al.*, 2022).



Obrázek 2. Schéma závislosti relativního rizika varianty (RR) na alelické frekvenci jejího výskytu v populaci (MAF, minor allele frequency). Převzato a upraveno z (Foulkes, 2008, Manolio *et al.*, 2009).

1.4. Karcinom pankreatu

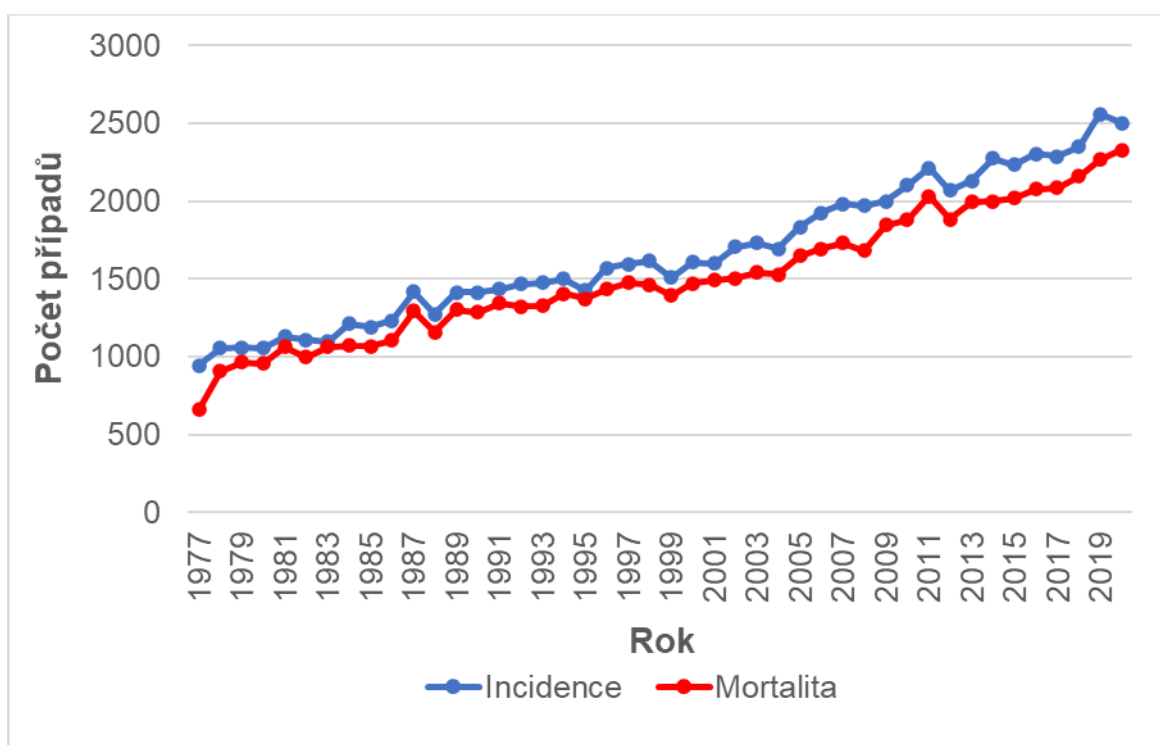
1.4.1. Epidemiologie karcinomu pankreatu

Slinivka břišní je orgán s exokrinní funkcí (sekrece trávicích enzymů) a zároveň s funkcí endokrinní (ostrůvky produkující hormony inzulin a glukagon). Skládá se z hlavy pankreatu, těla a ohonu. Nejčastější formou nádorového onemocnění pankreatu jsou karcinomy, tedy nádory pocházející z exokrinního parenchymu. Takovéto tumory tvoří 95 % všech nádorových onemocnění pankreatu, z toho 80 % představuje duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC). Zbýlých 5 % tvoří neuroendokrinní nádory. PDAC nejčastěji postihuje hlavu pankreatu (70-80 %), poté tělo (20 %) a nakonec ohon pankreatu (10 %) (Novotny *et al.*, 2019).

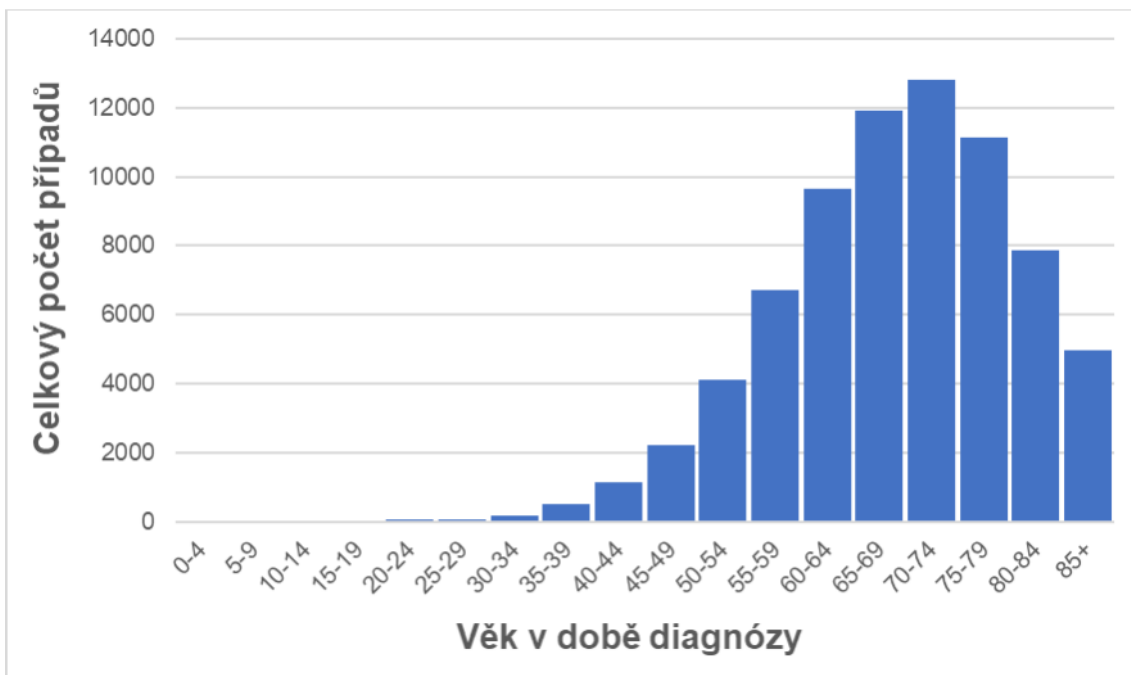
Karcinom pankreatu je čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění ve vyspělých zemích a je očekáváno, že se do deseti let stane druhou nejčastější (Rahib *et al.*, 2014). PDAC představuje nejčastější formu karcinomu pankreatu. Incidence PDAC v České republice setrvale narůstá, v roce 2020 tvořila 2504 případů, v přepočtu 23 případů na 100 000 osob (obrázek 3, www.svod.cz). Mortalita PDAC dlouhodobě nabývá podobných hodnot jako incidence. Za rok 2020 zemřelo na toto onemocnění 2327 pacientů, v přepočtu 22 jedinců na 100 000 osob (obrázek 3). Většina případů PDAC je diagnostikována po 55. roku života (89 %, obrázek 4, www.svod.cz). PDAC představuje onemocnění s jednou z nejhorších prognóz mezi všemi nádorovými onemocněními. Pětileté přežití pacientů s PDAC je pouhých 7 % a za posledních 40 let se prakticky nezlepšilo. Medián přežití se udává na mezi 20-22 měsíci (Yabar and Winter, 2016). Důvodů vysoké mortality je několik. PDAC bývá diagnostikován až v pozdních stádiích, což je dáno nespecifickými nebo zcela chybějícími symptomy. V České republice představují klinická stadia III a IV až 77 % všech diagnostikovaných případů (obrázek 5, www.svod.cz). Scházejí také dostatečně citlivé a specifické tumorové markery, přičemž zobrazovací metody (například endoskopická ultrasonografie, magnetická rezonance nebo výpočetní tomografie) nejsou dostatečně citlivé, aby spolehlivě odhalily karcinom v raných fázích. PDAC je agresivní onemocnění, které je navíc odolné vůči většině léčebných postupů, ať už jde o chemoterapii, radioterapii nebo cílenou molekulární terapii. Jediným spolehlivým způsobem léčby PDAC je chirurgický zákrok, který ale lze provést pouze u pacientů s raným stadiem nemoci (stadia I a II). PDAC má rovněž komplexní nádorové mikroprostředí a četné genetické a epigenetické změny. Všechny zmíněné faktory tak mají za následek zmíněné 7%

pětileté přežití (Kleeff *et al.*, 2016). Velkou část přeživších představují pacienti, kteří podstoupili chirurgický zákrok. U takovýchto pacientů je pětileté přežití 15-25 % (He *et al.*, 2014).

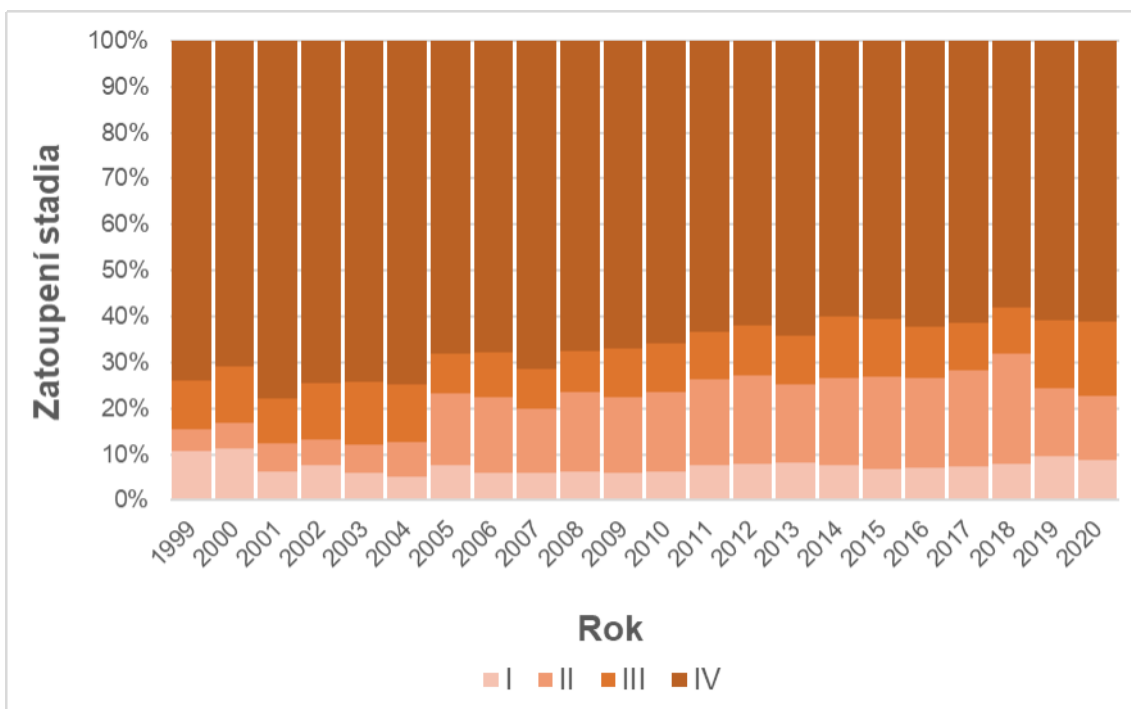
PDAC se projevuje podle lokalizace v rámci slinivky. Pacienti s onemocněním zasahujícím pravou stranu pankreatu (hlava, krk) v 75 % trpí žloutenkou kvůli obstrukci žlučových cest. Dalšími symptomy PDAC jsou hubnutí, bolesti břicha a zad, diabetes mellitus a nevolnost (Yabar and Winter, 2016).



Obrázek 3. Křivky incidence (modrá) a mortality (červená) pacientů s PDAC od roku 1977. Křivka incidence PDAC dlouhodobě narůstá. Vysoká mortalita PDAC téměř kopíruje křivku incidence. Údaje získány z www.svod.cz.



Obrázek 4. Celkové rozložení věku pacientů v době diagnózy PDAC. Osa y popisuje počet všech zaznamenaných pacientů. Incidence výrazně stoupá po 55. roku života. Údaje získány z www.svod.cz.



Obrázek 5. Procentuální zastoupení jednotlivých klinických stadií PDAC v době diagnózy mezi lety 1999-2020. Nejčastěji jsou zastoupena pokročilá stadia (III a IV). Údaje získány z www.svod.cz.

1.4.2. Patogeneze karcinomu pankreatu

Ke vzniku PDAC přispívají jak genetické, tak negenetické faktory. Mezi hlavní negenetické faktory patří věk. Naprostá většina případů PDAC nastává po 55. roku života. Podobně dobře popsáním rizikovým faktorem je kouření, kdy aktivní kuřáci mají zvýšené relativní riziko PDAC $RR = 1,7$ (Iodice *et al.*, 2008). Výše rizika je úměrná počtu denně vykouřených cigaret. U bývalých kuřáků pak riziko klesá a na běžnou populační hodnotu se vrací po 20 letech od skončení kouření (Yabar and Winter, 2016). Obezita je dalším rizikovým faktorem PDAC, stejně jako nízká fyzická aktivita a vysoký přísun tuků. Konzumace zeleniny a ovoce má slabý protektivní účinek (Kleeff *et al.*, 2016). Nepřímé přispění k PDAC může mít i konzumace velkého množství alkoholu, který je spojen se vznikem chronické pankreatitidy, čímž se riziko PDAC zvyšuje až desetkrát. Dalším faktorem predisponujícím k PDAC je diabetes mellitus, který ale může být i projevem PDAC. Zatímco dlouhodobý diabetes mellitus zvyšuje riziko PDAC přibližně dvakrát (Bosetti *et al.*, 2014), nově vzniklý diabetes u starších lidí může být naopak známkou PDAC (Bosetti *et al.*, 2014, Chari *et al.*, 2008).

PDAC nejčastěji vzniká z pankreatické intraepiteliální neoplázie (PanIN), může ale vzniknout i z větších prekurzorových lézí (intraduktální papilární mucinózní neoplázie IPMN, mucinózní cystická neoplázie) (Hezel *et al.*, 2006, Tanaka, 2014). Incidence PanIN stadia 3 je podobná jako samotného PDAC, což naznačuje, že právě tyto premalignity progredují na PDAC. Yachida *et al.* odhadli dobu vývoje PDAC na přibližně 20 let (Yachida *et al.*, 2010).

Stadia onemocnění jsou popsána pomocí TNM klasifikace (tabulka 1). Stadia I a II jsou lokální a operovatelná, zatímco stadium III je již pokročilé a stadium IV je metastatické.

Mezi genetické faktory predisponující k PDAC patří jednoznačně rodinný výskyt tohoto karcinomu. Rodinná forma PDAC je definována jako alespoň dva přímí příbuzní s onemocněním (Klein, 2012). Jedinec, v jehož přímé rodině se vyskytují tři případy PDAC, má kumulativní riziko tohoto onemocnění 40 %. Pro dva přímé příbuzné je toto riziko 10 % a pro jednoho 6 % (Klein *et al.*, 2004).

Tabulka 1. Definice stadií karcinomu pankreatu. Převzato a upraveno z (Yabar and Winter, 2016, Edge and Compton, 2010, Novotny *et al.*, 2019)

T kategorie	Primární nádor
TX	Primární nádor nelze hodnotit.
T0	Bez známek primárního nádoru.
Tis	Karcinom <i>in situ</i> .
T1	Nádor ≤ 2 cm, omezen na pankreas.
T2	Nádor > 2 cm, omezen na pankreas.
T3	Nádor infiltruje okolní tkáň.
T4	Nádor infiltruje viscerální tepny.
N kategorie	Regionální mízní uzliny
NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit.
N0	Nejsou zasaženy mízní uzliny.
N1	Metastázy v 1-3 regionálních mízních uzlinách.
N2	Metastázy v ≥ 4 regionálních mízních uzlinách.
M kategorie	Vzdálené metastázy
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit.
M0	Nejsou vzdálené metastázy.
M1	Vzdálené metastázy.
FIGO stadia	
Stadium 0	Tis, N0, M0
Stadium IA	T1, N0, M0
Stadium IB	T2, N0, M0
Stadium IIA	T3, N0, M0
Stadium IIB	T1-3, N1, M0
Stadium III	T4, N0-1, M0
Stadium IV	T1-4, N0-1, M1

Během kancerogeneze PDAC dochází u více než 90 % případů k aktivační mutaci v *KRAS* protoonkogenu. Inaktivační mutace v tumor supresorových genech *TP53*, *CDKN2A* a *SMAD4* jsou také běžné, vyskytují se v 50-80 % případů (Kleeff *et al.*, 2016).

Pro pacienty s více jak dvěma přímými příbuznými s PDAC, Peutzovým-Jeghersovým syndromem, LS u jednoho přímého příbuzného, nebo u jedinců se zárodečnou mutací (*CDKN2A*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*) se doporučuje provádět skreening ultrasonografií nebo magnetickou rezonancí (Goggins *et al.*, 2020, Yabar and Winter, 2016). V České

republiky jsou dnes všichni pacienti s PDAC indikováni na genetické vyšetření zárodečných variant.

Sporadická složka PDAC je udávána na 90 % všech případů, přičemž zbylých 10 % tvoří familiární případy (Turati *et al.*, 2013). Z těchto familiárních případů je přibližně u 20 % diagnostikován některý známý hereditární syndrom (kapitola 1.4.3) (Novotny *et al.*, 2019).

1.4.3. Dědičné predispozice ke karcinomu pankreatu

1.4.3.1. Syndrom familiárního melanomu

Syndrom familiárního melanomu (FAMMM, familial atypical multiple mole melanoma) je autozomálně dědičné onemocnění, které je charakterizováno velkým množstvím částečně dysplastických znamének a maligních melanomů u dvou či více přímých příbuzných (prvního i druhého stupně). V rámci FAMMM dochází k současnému výskytu dalších extrakutánních nádorů. Syndrom je způsoben zárodečnou mutací v genu *CDKN2A* (OMIM #600160). Tento gen má 10 exonů, je lokalizován na 9p21.3 a kóduje proteiny účastníci se regulačních drah buněčného cyklu: p53 regulační dráhy a RB1 dráhy. *CDKN2A* pomocí alternativního sestřihu produkuje dva proteiny: p16, který je inhibitorem cyklin dependentní kinázy 4, a p14, který interakčním partnerem pro MDM2 protein, který stabilizuje p53 (Robertson and Jones, 1999). Somatické mutace v *CDKN2A* se vyskytují u 83-96 % PDAC tkání (Yabar and Winter, 2016, Jones *et al.*, 2008). PDAC se objevuje u 25 % rodin s FAMMM syndromem. Fenotyp tohoto syndromu byl popsán u 12 % rodin s výskytem familiárního PDAC (Gentiluomo *et al.*, 2022, Bartsch *et al.*, 2002). Nosiči zárodečných mutací v *CDKN2A* mají více než poloviční pravděpodobnost, že vyvinou melanom coby prevalentní fenotyp, nikoliv PDAC. Pro rodiny charakterizované výskytem melanomu i PDAC se tak zavádí samostatný nádorový syndrom zvaný MPS (melanoma-pancreatic cancer syndrome, OMIM #606719) (Lynch *et al.*, 2002, Rulyak *et al.*, 2003).

V rodinách, kde se vyskytují zárodečné mutace v *CDKN2A*, je 13-22× zvýšené riziko vzniku PDAC (Goldstein *et al.*, 1995, Moskaluk *et al.*, 1998).

Ve studii 225 neselektovaných italských pacientů bylo identifikováno 5,7 % nosičů zárodečných mutací v *CDKN2A*. U rodin s familiárním výskytem PDAC ale prevalence nosičů tvořila až 31 % (Ghiorzo *et al.*, 2012).

Dvě holandské studie se zaměřovaly na zárodečné mutace v *CDKN2A* a jejich spojitost s výskytem PDAC. V první studii byla nalezena founder varianta c.225_243del (delece 19 bp; p16-Leiden) v exonu 2 proteinu p16. Nosiči této mutace měli kumulativní riziko vzniku PDAC do 75. roku života 17 % (Vasen *et al.*, 2000). Druhá studie identifikovala 172 rodin, ve kterých bylo 649 nosičů 15 různých zárodečných patogenních variant. Nejčastější byla founder mutace p16-Leiden. Ze 163 rodin s výskytem zárodečných variant v p16 se PDAC objevil v 95 rodinách (58 %). U rodin, kde se vyskytovaly zárodečné mutace postihující p14, nebyl PDAC detekován (0/9 rodin) (Overbeek *et al.*, 2021). Nosiči zárodečných mutací v genu *CDKN2A* měli v této studii kumulativní riziko vzniku PDAC do 75. roku života 19 %.

1.4.3.2. Peutzův-Jeghersův syndrom

Peutzův-Jeghersův syndrom (PJS) je autozomálně dominantní dědičné onemocnění, které se vyskytuje s incidencí 1:25 000 (Gentiluomo *et al.*, 2022). Toto onemocnění je charakterizováno výskytem hamartomů tlustého střeva, zvýšeným rizikem vývoje různých druhů nádorů a pigmentovými skvrnami na rtech, bukální mukóze a na prstech. Gen, s kterým je spojen výskyt až 70 % všech případů PJS, je *STK11* (OMIM #602216). Tento gen má 10 exonů, je lokalizován na 19p13.3 a kóduje pro serin/threonin kinázu 11 (433 aminokyselin). *STK11* je také znám pod jménem *LKB1* a jeho proteinový produkt jako jaterní kináza B1. *STK11* je tumor supresorový gen, který je zapojen do procesu kontroly apoptózy v rychle se dělicích buňkách. Konkrétní proces, kterým se *STK11* podílí na procesu kancerogeneze, je zatím neznámý (Zeqiraj *et al.*, 2009).

Nosiči patogenních variant v *STK11* mají celoživotní kumulativní riziko vzniku PDAC 11-36 % a relativní riziko zvýšené až 132× (Giardiello *et al.*, 2000, Giardiello *et al.*, 1987, Boardman *et al.*, 1998, Matsubayashi, 2011, Gentiluomo *et al.*, 2022).

1.4.3.3. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií

HBOC je asociován s řadou genů účastnících se DNA reparačních pochodů, a to zejména dráhy HR a opravy meziřetězcových spojů (kapitola 1.2.5.2). Nejznámějšími predispozičními geny pro HBOC jsou vysoce penetrantní *BRCA1* (OMIM #113705) a *BRCA2* (OMIM #600185).

Gen *BRCA1* je složen z 24 exonů a nachází se na chromosomu 17q21.31. Jeho proteinový produkt je 1863 aminokyselin dlouhý fosfoprotein, který v heterodimeru

s BARD1 získává E3 ubikvitinproteinligázovou aktivitu (Wu-Baer *et al.*, 2003). Studie s celkem 11 847 jedinci z 669 rodin stanovila u nosičů mutací v *BRCA1* relativní riziko vzniku PDAC na $RR = 2,26$ (Thompson *et al.*, 2002). Novější studie od Mocci *et al.* toto riziko upravila na $4,11\times$ zvýšené obecně a do věku 50 let zvýšené až $7,75\times$ (Mocci *et al.*, 2013). Riziko vzniku PDAC u nosičů *BRCA1* mutací je ale nejspíš nižší, jak dokazuje studie od Axilbund *et al.*, kteří ve svém souboru 66 pacientů nenašli žádnou mutaci v *BRCA1*, a studie od Hruban *et al.*, kteří stanovili riziko vzniku PDAC u nosičů mutace v *BRCA1* na $RR = 2$ (Hruban *et al.*, 2007, Axilbund *et al.*, 2009). Vyšší frekvence mutací *BRCA1* byla popsána u pacientů s časnou diagnózou PDAC (Salo-Mullen *et al.*, 2015).

Gen *BRCA2* se skládá z 27 exonů a je lokalizován na chromosomu 13q13.1. Jeho proteinový produkt je 3418 aminokyselin dlouhý. U PDAC pacientů z HBOC rodin je popsána zvýšená prevalence zárodečných patogenních variant v *BRCA2* (Murphy *et al.*, 2002). Relativní riziko PDAC pro nosiče mutací v *BRCA2* bylo odhadnuto v intervalu 3,5-8,0. Riziko bylo závislé na počtu PDAC případů v rodině (Gentiluomo *et al.*, 2022). V populaci aškenázských Židů byla identifikována rekurentní mutace (c.6174del), u které byla popsána asociace s výskytem familiárního PDAC. Riziko vzniku PDAC v těchto rodinách bylo až desetinásobné (Ozcelik *et al.*, 1997, Lynch *et al.*, 2004).

Další studie se zaměřily na evropské HBOC rodiny bez židovských kořenů. Murphy *et al.* identifikovali 17% frekvenci zárodečných mutací v *BRCA2* v pěti rodinách, kde ≥ 3 rodinných příslušníků mělo příznaky PDAC (Murphy *et al.*, 2002). Hahn *et al.* popsali 19% frekvenci *BRCA2* mutací ve 26 rodinách, u kterých se objevovali ≥ 2 přímí příbuzní s PDAC diagnózou (Hahn *et al.*, 2003).

Novější studie z roku 2015 vyšetřovala 154 pacientů s PDAC. V této studii bylo identifikováno 24 zárodečných patogenních variant (15 %), z nichž bylo 13 v genu *BRCA2* (Salo-Mullen *et al.*, 2015).

PALB2 (OMIM #610355) je gen účastníící se HR DNA opravné dráhy a opravy meziřetězcových spojů. Je tvořen 14 exony a lokalizován je na chromosomu 16p12.2. Jeho 1186 aminokyselin dlouhý proteinový produkt slouží jako strukturní prvek při tvorbě BRCA1-PALB2-BRCA2 komplexu během HR (Sy *et al.*, 2009). Jeho zárodečné mutace jsou spojeny zejména s predispozicí ke karcinomu prsu, ale také k PDAC. Riziko vzniku PDAC u nosičů mutací v tomto genu je odhadováno na $10-32\times$ zvýšené, podle počtu zasažených příbuzných (Jones *et al.*, 2009, Slater *et al.*, 2010). Blanco *et al.*

identifikovali 3-4 % nosičů zárodečných mutací v *PALB2* mezi pacienty s PDAC (Blanco *et al.*, 2013). Podobně tak další studie odhadly prevalenci zárodečných mutací v tomto genu na 1,5-4,8 % (Hofstatter *et al.*, 2011, Schneider *et al.*, 2011, Peterlongo *et al.*, 2011, Tischkowitz *et al.*, 2009). Yang *et al.* určili relativní riziko spojené se zárodečnými mutacemi *PALB2* na $RR = 2,4$ (Yang *et al.*, 2020). *PALB2* zárodečné mutace se vykytují přibližně v 5 % rodinného výskytu PDAC (Gentiluomo *et al.*, 2022). Menší studie (do 100 jedinců) zárodečné mutace v tomto genu nenalezly (Stadler *et al.*, 2011, Adank *et al.*, 2011, Harinck *et al.*, 2012).

Gen, pro který byla rovněž popsána asociace se vznikem PDAC, je *ATM* (OMIM #607585). *ATM* je složen z 67 exonů a nachází se na chromosomu 11q22.3. Jeho 3056 aminokyselin dlouhý proteinový produkt je serin/threonin kináza účastnící se odpovědi na poškození DNA (Banin *et al.*, 1998). Roberts *et al.* ve své studii ukázali, že přibližně 2,4 % pacientů s PDAC je nosiči zárodečných mutací v *ATM*, nicméně u rodin s ≥ 3 případy PDAC se prevalence mutací v *ATM* zvedla na 4,6 % (Roberts *et al.*, 2012).

1.4.3.4. Lynchův syndrom

Lynchův syndrom (LS), také známý jako hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, je autozomálně dědičné onemocnění způsobené zárodečnými mutacemi v genech MMR DNA opravné dráhy (kapitola 1.2.4), konkrétně v genech *MLH1* (OMIM #120436), *MSH2* (OMIM #609309), *MSH6* (OMIM #600678) a *PMS2* (OMIM #600259) (Lynch and Lynch, 1993). LS může být také způsoben delecí 3' konce genu *EPCAM*, který kóduje transmembránový glykoprotein a jehož sekvence se nachází před genem *MSH2*. V případě delece 3' koncové části *EPCAM* tak úplně chybí promotorová oblast *MSH2* a tím dochází k umlčení jeho exprese (Huth *et al.*, 2012). Nádorová onemocnění způsobená LS vznikají v mladém věku a bývají mnohočetná. Jednotlivé geny LS ale nejsou asociovány se stejným rizikem vzniku onemocnění. To je dáno způsobem, jakým spolu proteinové produkty těchto genů interagují. Jak bylo zmíněno v kapitole o MMR DNA opravné dráze, proteiny této dráhy se stabilizují tvorbou dimerů. *MLH1* může tvořit dimer buď s *PMS2*, *PMS1*, nebo *MLH3* (Kondo *et al.*, 2001). Obdobně *MSH2* tvoří dimer s *MSH6* nebo *MSH3* (Acharya *et al.*, 1996). *MLH1* a *MSH2* jsou nezbytnými partnery pro zmíněné proteiny, dojde-li tedy ke ztrátě exprese *MLH1* a *MSH2*, následkem bude i ztráta přítomnosti *PMS2* či *MSH6*. Inaktivace genů *MLH1* a *MSH2* je tak spojena s vyšším rizikem projevu LS než ztráta exprese *PMS2* nebo *MSH6*. Delece v genu *EPCAM* vedoucí k zasažení *MSH2* tak

může vyústit ke ztrátě exprese MSH2 a MSH6 i bez přímé mutace *MSH2* (Kempers *et al.*, 2011, Perez-Cabornero *et al.*, 2011).

LS má dvě formy, odlišující se podle lokalizace nádorových onemocnění. LS I je charakterizován karcinomy tlustého střeva a konečníku (kolorektální karcinomy). Celoživotní riziko vzniku karcinomu kolorekta je pro nosiče mutací v genech LS 28-75 % u mužů a 24-52 % u žen (Plevova *et al.*, 2009). Oproti tomu LS II je spojen se zvýšeným rizikem vzniku nádorových onemocnění jiných tkání, jako jsou například karcinomy endometria (celoživotní riziko 27-72 %), ovaria (3-13 %), urotraktu (1-12 %), žaludku (2-13 %), hepatobiliárního systému (2 %), tenkého střeva (4-7 %) a mozku (1-4 %) (Lynch *et al.*, 1988, Plevova *et al.*, 2009).

Riziko PDAC v rodinách s LS představuje přibližně 5 % do 70 let (Hruban *et al.*, 2007, Gentiluomo *et al.*, 2022). Studie analyzující data od 147 rodin s výskytem zárodečných mutací v MMR genech odhadla kumulativní riziko vzniku PDAC na 1,3 % u lidí mladších 50 let a 3,7 % u lidí mladších 70 let. Celkové riziko PDAC bylo navýšeno 8,6× oproti běžné populaci (Kastrinos *et al.*, 2009).

Ze čtyř hlavních genů, jejichž zárodečné varianty způsobují LS, je asociace se vznikem PDAC nejlépe popsána u genu *MLH1*. Role ostatních genů MMR v kancerogenezi PDAC není zatím zcela známá.

V anglické studii z roku 2008 Geary *et al.* analyzovali přítomnost zárodečných mutací u 130 rodin s výskytem LS. Celkově identifikovali 22 pacientů s PDAC, z nichž bylo 11 nosiči zárodečných mutací, nejvíce v genech *MLH1* a *MSH2*. Nosiči zárodečných mutací *MLH1/MSH2* měli až 7× zvýšené riziko vzniku PDAC než běžná populace, a 15× navýšené riziko vzniku PDAC před 60. rokem života (Geary *et al.*, 2008).

Retrospektivní studie 3119 pacientů s LS srovnávala rozdíl v kumulativním riziku vzniku PDAC do 75 let mezi nosiči zárodečných mutací a běžnou populací. Nosiči mutací v genu *MLH1* mají relativní riziko $RR = 7,8$ (95% CI: 3,3-12,3), kdežto nosiči mutací v ostatních genech LS neměli navýšené riziko (Moller *et al.*, 2018).

Dudley *et al.* identifikovali vyšší prevalenci *MSH6* nosičů než *MLH1* a *MSH2* (Dudley *et al.*, 2018). Podobně Mannucci *et al.* analyzovali familiární PDAC u rodin bez výskytu kolorektálního karcinomu a identifikovali patogenní variantu v *MSH6* c.2194C>T,

p.(Arg732Ter). Z celkem sedmi nosičů této mutace tři vyvinuli PDAC a jedna nosička karcinom endometria (Mannucci *et al.*, 2020).

Mutace v *MLH1* a *MSH2* se vyskytují také somaticky v tkáních sporadických PDAC, a to přibližně v 4-11 % případů. V těchto nádorových tkáních byla zároveň identifikována mikrosatelitová nestabilita (4 % PDAC) (Goggins *et al.*, 1998, Gentiluomo *et al.*, 2022).

1.4.3.5. Hereditární pankreatitida

Hereditární pankreatitida (HP) je onemocnění charakterizované opakovanými epizodami závažné pankreatitidy vedoucí k chronickému stavu. HP je typicky diagnostikována v raném věku a přináší s sebou 50-60× navýšené riziko vzniku PDAC (Lowenfels *et al.*, 2000). Kumulativní riziko vzniku PDAC je podobné u obou pohlaví ve věku 50-75 let (11-49 % pro muže, 8-55 % pro ženy) (Lowenfels *et al.*, 1997, Rebours *et al.*, 2008, Rieder and Bartsch, 2004, Gentiluomo *et al.*, 2022).

Přibližně v 70 % rodin s výskytem HP se objevují mutace v genu *PRSSI* (OMIM #276000) (Whitcomb *et al.*, 1996, Etemad and Whitcomb, 2001). Tento gen se nachází na chromosomu 7q34, skládá se z 5 exonů a kóduje isoformu 1 serinové proteázy (také známé jako kationtový trypsinogen). *PRSSI* představuje přibližně dvě třetiny celkového trypsinogenu produkovaného pankreatem (Teich *et al.*, 2004).

Méně časté jsou zárodečné mutace v genu *SPINK1* (OMIM #167790). Tento gen se nachází na chromosomu 5q32, skládá se z 6 exonů a kóduje pankreatický inhibitor trypsinu. Jeho role spočívá v zamezení předčasné aktivace zymogenů trypsinem ještě v rámci pankreatu. Jeho hladina je detekovatelná v séru při pankreatitidě a závažných infekcích (Stenman *et al.*, 1991).

Zárodečné mutace v *PRSSI* a *SPINK1* poškozují regulaci funkce trypsinu, což vede k aktivaci zymogenní kaskády v rámci pankreatického parenchymu. To má za následek aktivaci trávicích enzymů a samotrávení slinivky. Vzniklé zánětlivé mikroprostředí v kombinaci s chronickým poškozením tkáně jsou pravděpodobnými faktory přispívajícími ke zvýšené predispozici ke vzniku PDAC (Gentiluomo *et al.*, 2022, Lowenfels *et al.*, 1993).

1.4.3.6. Cystická fibróza

Cystická fibróza je autozomálně recesivní onemocnění způsobené zárodečnými mutacemi v *CFTR* genu (OMIM #602421). Tento gen je tvořen 27 exony, nachází se na

chromosomu 7q31.2 a kóduje chloridový kanál o 1480 aminokyselinách. Porušení funkce CFTR kanálu je spojeno s cystickou fibrózou, onemocněním charakterizovaným zejména špatnou funkcí plicního epitelu a následnými plicními infekcemi, insuficiencí zevní sekrece pankreatu, vysokou koncentrací elektrolytů v potu a poruchou reprodukce mužů.

Možná spojitost zárodečných mutací v *CFTR* byla vyšetřována několika studii. McWilliams *et al.* analyzovali kohortu 949 pacientů s PDAC a 13 340 kontrol. Jejich výsledky stanovily nízkou, nicméně statisticky významnou asociaci zárodečných mutací v *CFTR* se vznikem PDAC (OR = 1,4; 95% CI: 1,04-1,89; p = 0,027) (McWilliams *et al.*, 2010). Další studie prováděla metaanalýzu asociačních studií s celkem 1674 pacienty s PDAC. I tato studie pozorovala mírné navýšení rizika pro nosiče mutací v *CFTR* (OR = 1,4; 95% CI: 1,07-4,84) (Cazacu *et al.*, 2018).

Mechanismus, kterým by ale měl CFTR protein přispívat ke kancerogenezi, není popsán. Je nicméně známo, že CFTR je exprimován v nemaligních pankreatických buňkách a že v PDAC buněčných liniích dochází až k 80% snížení jeho exprese. CFTR slouží jako regulátor funkce jiných proteinů, mezi nimiž je nejspíše i MUC4, glykoprotein zapojený do pankreatické kancerogeneze (Gentiluomo *et al.*, 2022, Singh *et al.*, 2007).

1.4.3.7. Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je dědičným syndromem spojeným se vznikem velkého množství benigních polypů v tlustém střevě, které později malignizují. Syndrom je způsoben zárodečnými mutacemi v genu *APC* (OMIM #611731), který je složen z 20 exonů a je lokalizován na 5q22.2. *APC* kóduje tumor supresorový protein účastnící se WNT signální dráhy. *APC* tak hraje roli v buněčné migraci, adhezi, chromosomové segregaci a apoptóze (Hanson and Miller, 2005). I když role *APC* je zejména spojená s FAP, objevily se i možné asociace s dalšími nádorovými onemocněními mimo tlusté střevo. Giardiello *et al.* udávají zvýšené relativní riziko vzniku PDAC u rodin s FAP (RR = 4,46; 95% CI: 1,2-11,4) (Giardiello *et al.*, 1993). Jiná studie identifikovala mezi 86 vysoce rizikovými pacienty jednoho nosiče zárodečné mutace v *APC* (DaVee *et al.*, 2018). Asociace mezi *APC* a predispozicí k PDAC je nejasná.

1.4.3.8. Další kandidátní predispoziční geny

Možná asociace s predispozicí k vzniku PDAC byla popsána i u dalších genů.

TP53 (OMIM #191170) je tumor supresorovým genem, jehož zárodečné patogenní varianty způsobují Liův-Fraumeniho syndrom. Jeho statisticky signifikantní asociace s PDAC byla popsána v jedné studii, která vyčíslila riziko spojené se zárodečnými mutacemi na $RR = 7,3$ (Ruijs *et al.*, 2010).

SMAD4 (OMIM #600993) a *BMPRIA* (OMIM #601299) jsou geny spojené s juvenilní polypózou. Jejich asociace s PDAC byla navržena ve dvou studiích (Ishida *et al.*, 2018, Wain *et al.*, 2014).

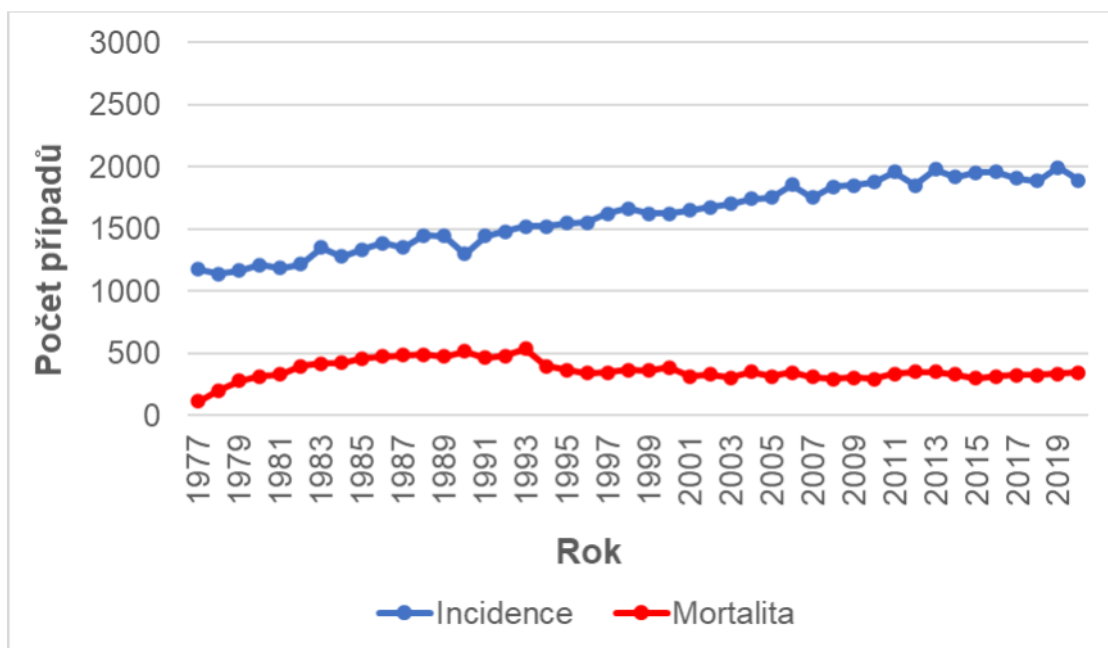
CPA (OMIM #114850) a *CPBI* (OMIM #114852) jsou geny spojené se stresem endoplasmatického retikula pankreatických acinárních buněk a tím i zvýšeným rizikem pankreatitidy (Witt *et al.*, 2013). Jejich možné zapojení do kancerogeneze PDAC bylo zmíněno v jedné publikaci (Tamura *et al.*, 2018).

O možném zapojení do kancerogeneze se rovněž spekulovalo u genů Fanconiho anemie *FANCC* (OMIM #613899) a *FANCG* (OMIM #602956) (Couch *et al.*, 2005, van der Heijden *et al.*, 2003).

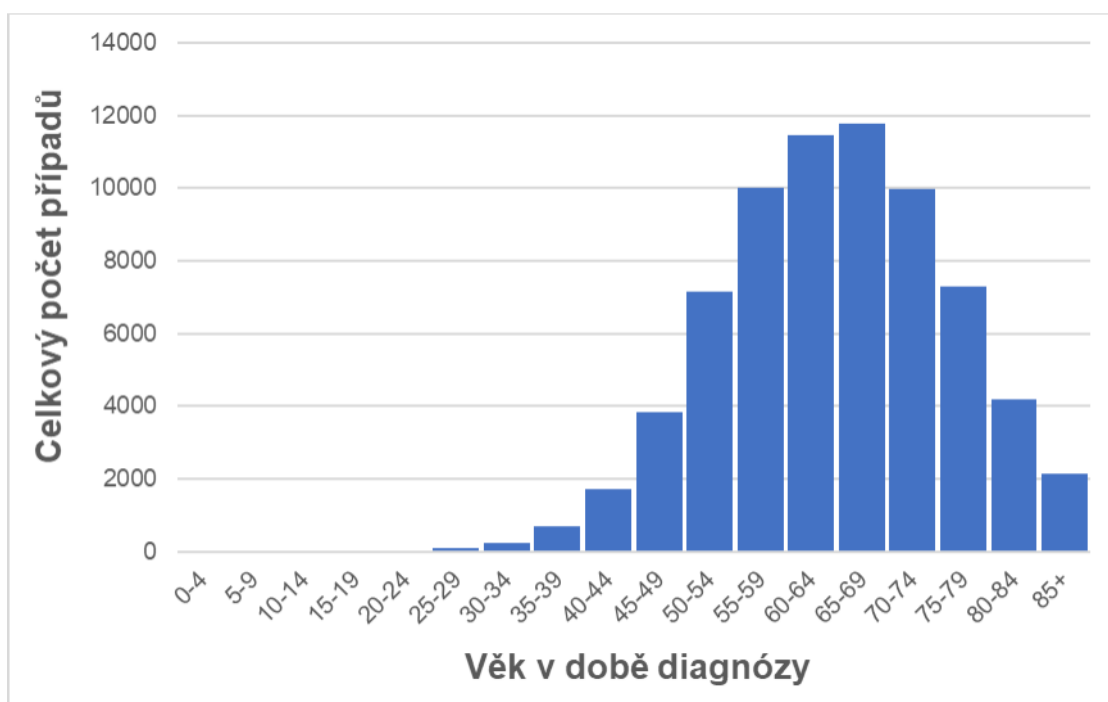
1.5. Karcinom endometria

1.5.1. Epidemiologie karcinomu endometria

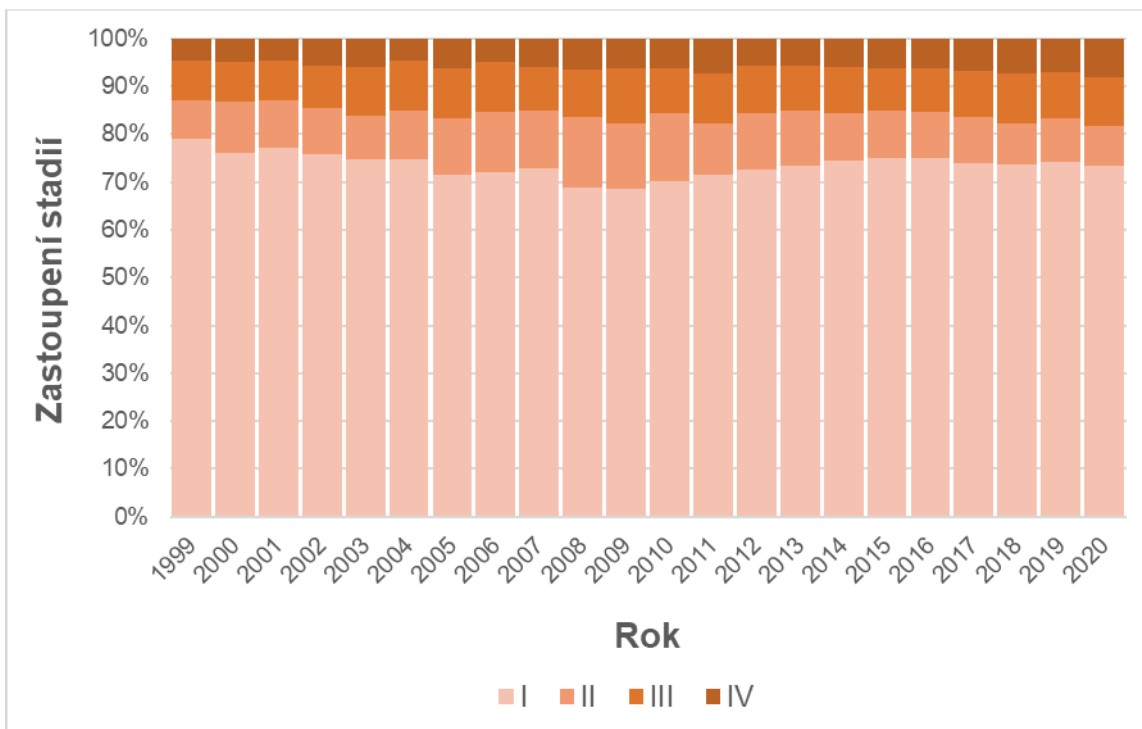
Karcinom endometria (EC) je zhoubným nádorovým onemocněním vnitřní epitelové výstelky dělohy. EC je nejčastějším gynekologickým nádorovým onemocněním celosvětově a čtvrtým nejčastějším nádorem u žen (Bray *et al.*, 2018, Ferlay *et al.*, 2019). Incidence EC v České republice za rok 2020 činila 1893 případů (obrázek 6, www.svod.cz) a dlouhodobě stoupá, v přepočtu se jednalo o 36 případů na 100 000 žen. Nicméně, mortalita EC je dlouhodobě stabilní, za rok 2020 tvořila 345 případů (18 % mortalita). V porovnání s PDAC, pro který je mortalita 93,0 %, se tak jedná až o pětkrát nižší mortalitu. Naprostá většina případů EC je diagnostikována po 55. roku života (76 %, obrázek 7) s nejvyšší incidencí v rozmezí 65-69 let. Většina případů je diagnostikována postmenopauzálně a v raných stádiích onemocnění (stadia I-II: 78 % za rok 2020; obrázek 8), k čemuž přispívají typické symptomy EC (abnormální krvácení). U pacientek s pokročilou formou onemocnění se může EC projevat bolestmi a rozpínáním břišní dutiny, spolu se zácpami, stejně jako i průjmy (Makker *et al.*, 2021). Včasná diagnóza EC se promítá do relativně dobré prognózy onemocnění a úspěšné léčby.



Obrázek 6. Křivky incidence (modrá) a mortality (červená) pacientek s EC od roku 1977. Mortalita EC dlouhodobě setrvává pod hladinou 500 případů za rok. Údaje získány z www.svod.cz.



Obrázek 7. Celkové rozložení věku pacientek v době diagnózy EC. Osa y popisuje počet všech zaznamenaných pacientek. Incidence výrazně stoupá po 55. roku života. Údaje získány z www.svod.cz.



Obrázek 8. Procentuální zastoupení jednotlivých klinických stadií EC v době diagnózy mezi lety 1999-2020. Nejčastěji jsou zastoupena raná stadia (I a II). Údaje získány z www.svod.cz.

1.5.2. Patogeneze a klasifikace karcinomu endometria

Faktory ovlivňující riziko vzniku EC zahrnují věk ≥ 55 let, raný věk menarche, pozdní věk menopauzy, obezitu, diabetes mellitus II. typu, dlouhodobé vystavení nekompenzovaným estrogenům (endogenním i exogenním), nízká parita/nuliparita a genetické predispozice (Makker *et al.*, 2021). Naopak protektivní účinek proti EC má užívání orální antikoncepce, které snižuje riziko až o 50 % (Daniels and Lu, 2016), normální BMI (body mass index) a vysoká parita (Colombo *et al.*, 2016, Raglan *et al.*, 2019). Popsáno bylo rovněž zvýšené relativní riziko ($RR = 2,4$) vzniku EC u pacientek, kterým byl podáván tamoxifen jako terapie karcinomu prsu. Toto riziko je zvýšeno pouze během doby užívání tamoxifenu a s odstupem 0-5 let klesá na $RR = 1,5$ (Cuzick *et al.*, 2015). V České republice se tamoxifen až na výjimky nepoužívá.

Asociace mezi vznikem EC a obezitou je dobře zdokumentována a je patrná zejména u endometroidního EC. Pro ženy s BMI v rozmezí 25-30 kg/m^2 je relativní riziko vzniku EC $RR = 1,6$, zatímco se stoupajícím BMI se riziko zvyšuje. Pro BMI 30-35 kg/m^2 je riziko 2,6× zvýšené, pro BMI 35-40 kg/m^2 je zvýšené 4,8× a pro BMI ≥ 40 kg/m^2 je riziko vzniku EC navýšeno 6,9× (Setiawan *et al.*, 2013). Obezita přispívá k endometriální kancerogenezi

zvýšenou hladinou estrogenů, které jsou produkovány adipocyty z androgenů (Renehan *et al.*, 2015). Inzulínová rezistence, hyperinzulinémie, hyperglykémie a diabetes mellitus II. typu se rovněž podílejí na kancerogenezi EC (Liao *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2013, Saed *et al.*, 2019).

Nejčastější histologickou formou EC je endometroidní karcinom, který představuje 80 % všech případů EC, následovaný serózním karcinomem (10 % všech případů) a poté ostatními nádory, mezi něž patří nádory muscinózní, světlobuněčné, nádory skvamózních buněk a smíšené adenokarcinomy. Přibližně 5 % EC tvoří karcinosarkomy (Makker *et al.*, 2021, Cantrell *et al.*, 2015).

Nádory endometria byly historicky děleny dle histopatologických charakteristik na dva typy. EC typu I představují nádory asociované s působením nekompenzovaného estrogenu. Endometriální sliznice je citlivá na hormonální estrogenovou stimulaci, která indukuje mitózu epitelových buněk. Excesivní stimulace tak může vést k maligní transformaci. Mezi EC typu I patří nejčastější endometroidní karcinom (grade I-II). Nádory typu I mají obecně příznivou prognózu. Pětileté přežití pacientek s těmito nádory je 81 % (Makker *et al.*, 2021).

Do EC typu II oproti tomu spadají agresivnější serózní a světlobuněčné karcinomy, spolu s endometroidním karcinomem grade III. EC typu II jsou typicky nezávislé na působení estrogenu. Pětileté přežití pacientek s EC typu II je obecně 55 %, ale u pacientek, kterým byl EC diagnostikován ve stadiích IVA a IVB je přežití 17 % a 15 % (Makker *et al.*, 2021).

Stadia onemocnění jsou definována FIGO stupnicí (tabulka 2), případně pomocí TNM klasifikace. FIGO stadia popisují EC podle jeho růstu a infiltrace okolních tkání. Obecně lze hovořit o nízkých stadiích (stadia I a II), během nichž je přítomnost EC omezena na dělohu, a vysokých stadiích (stadia III a IV), kdy EC prorůstá do okolních tkání a metastazuje (Pecorelli, 2009).

Tradiční rozdělení EC na typ I a typ II bylo v poslední době přehodnocováno díky pokroku v molekulárních a sekvenačních technologiích. V roce 2013 vydali TCGA (The Cancer Genome Atlas) studii, v níž analyzovali 313 pacientek s EC, u nichž navrhli řazení EC do čtyř molekulárních skupin (Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2013). Toto nové

kategorizování EC bere v potaz mutační zátěž nádorové tkáně a diploidní/polyploidní charakter nádorového genomu.

První skupinou jsou nádory s polyploidním genomem (CNH, copy number high). Tato skupina je charakterizována vysokým množstvím plošných genomových alterací a rozsáhlých duplikací/deleci. Nádory spadající do CNH mají zpravidla vysoký grade, jsou agresivní a bezesbytku zahrnují serózní karcinomy. Mezi CNH patří také přibližně 25 % endometroidních karcinomů s vysokým gradem. Většina CNH nádorů má patogenní varianty v *TP53*. Prognóza CNH nádorů je ze všech molekulární skupin nejhorší.

Druhou molekulární skupinu tvoří EC s mikrosatelitovou nestabilitou (MSI). MSI je fenotyp vzniklý porušením funkce MMR DNA opravné dráhy, kdy došlo k inaktivování obou alel alespoň jednoho s MMR genů. Může se jednat o kombinaci germinálních a somatických mutací, často ve spojitosti s epigenetickým umlčením exprese genu (typicky *MLH1*) (Haraldsdottir *et al.*, 2014). Geny MMR dráhy (kapitola 1.2.4) spojené s MSI jsou *MLH1*, *MHS2*, *MSH6*, *PMS2*, případně *EPCAM*. Mutační zátěž EC s MSI je 10× vyšší než je běžné mutační pozadí. Prognóza těchto nádorů je středně dobrá (Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2013). Nádory v této skupině mají nezvyklou morfologii, jedná se ale vždy o endometroidní karcinomy a často se nacházejí v nižších segmentech dělohy (Zhao *et al.*, 2022, Makker *et al.*, 2021).

Třetí skupinu představují EC, u kterých došlo k somatickému zasažení exonukleázové domény DNA polymerázy ϵ , kódované genem *POLE* (OMIM #174762; exonukleázová doména: exony 9-14) (Leon-Castillo *et al.*, 2020). Zvýšená aktivita polymerázy v kombinaci se ztrátou schopnosti opravovat replikační chyby vede k tomu, že mutační pozadí nádorů této skupiny je až 100× vyšší, než je běžné. Tyto nádory tak mají typicky velké množství somatických mutací v mnoha nádorových genech. *POLE*-ultramutované nádory představují 7 % všech případů EC a mají velice příznivou prognózu (Makker *et al.*, 2021).

Tabulka 2. Definice stadií karcinomu endometria. Převzato a upraveno z (Pecorelli, 2009, Novotny *et al.*, 2019).

T kategorie	Primární nádor
TX	Primární nádor nelze hodnotit.
T0	Bez známek primárního nádoru.
Tis	Karcinom <i>in situ</i> .
T1	Nádor omezen na tělo dělohy.
T1a	Nádor postihuje méně než polovinu myometria.
T1b	Nádor postihuje více než polovinu myometria.
T2	Nádor infiltruje čípek, ale nešíří se mimo dělohu.
T3	Lokální a/nebo regionální šíření nádoru.
T3a	Nádor postihuje serózu těla děložního a/nebo adnexa.
T3b	Nádor postihuje pochvu nebo parametria.
T4	Nádor postihuje močový měchýř a/nebo sliznici střeva.
N kategorie	Regionální uzliny
NX	Regionální uzliny nelze hodnotit.
N0	Regionální uzliny bez metastáz.
N1	Metastázy v regionálních uzlinách.
M kategorie	Vzdálené metastázy
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit.
M0	Bez vzdálených metastáz.
M1	Vzdálené metastázy.
FIGO stadia	
Stadium 0	Tis, N0, M0
Stadium IA	T1a, N0, M0
Stadium IB	T1b, N0, M0
Stadium II	T2, N0, M0
Stadium IIIA	T3a, N0, M0
Stadium IIIB	T3b, N0, M0
Stadium IVA	T4, N0-1, M1
Stadium IVB	T1-4, N0-1, M1

Poslední, čtvrtou skupinou v molekulární klasifikaci EC jsou nádory CNL (copy number low). Tyto EC nemají zvýšenou mutační zátěž a zpravidla disponují diploidním genomem. U CNL EC byla zaznamenána zvýšená exprese progesteronového receptoru, tento typ EC by tak mohl dobře odpovídat na hormonální terapii. Prognóza těchto nádorů je středně dobrá (Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2013).

Naprostá většina případů EC je sporadického původu, nicméně 3-5 % případů tvoří dědičné formy EC, nejčastěji asociované s LS (Spurdle *et al.*, 2017). I přes známou asociaci EC s LS ale není u většiny familiárních případů EC identifikována příčinná hereditární predispozice.

1.5.3. Dědičné predispozice ke karcinomu endometria

1.5.3.1. Lynchův syndrom

V současné době je dědičná forma EC uvažována pouze v kontextu LS. Jedná se o autozomálně dominantní dědičné onemocnění zapříčiněné patogenními variantami v genech účastnících se MMR DNA opravné dráhy (kapitoly 1.2.4 a 1.4.3.4).

EC je druhým nejčastějším projevem LS po karcinomu kolorekta. U žen nesoucích mutace v predispozičních genech se navíc projevuje dříve než kolorektální karcinom, představuje tak určitý „varovný“ nádor LS (Lu *et al.*, 2005). Pravděpodobnost, že nosička mutace v genech LS vyvine EC jako první nádor, je 40-60 % (Tafe *et al.*, 2014).

Riziko vzniku EC do 70 let je pro nosičky patogenní zárodečné varianty v *MLH1* 18 % (9-34 %), *MSH2* 30 % (18-45 %), *MSH6* 26 % (18-36 %), *PMS2* 12-15 % a pro pacientky s 3' delecí *EPCAM* 12 % (0-27 %) (Baglietto *et al.*, 2010, Dowty *et al.*, 2013, Spurdle *et al.*, 2017).

Nosičky patogenních variant v genech LS mají zpravidla nižší věk diagnózy EC a nižší BMI než pacientky se sporadickým EC. Věk v době diagnózy nádoru se liší v závislosti na zasaženém genu. Průměrný věk EC diagnózy u nosiček mutací v genech *MLH1* a *MSH2* se pohybuje v rozmezí 39-49 let, zatímco u pacientek s mutacemi v genu *MSH6* v rozmezí 50-59 let (Ryan *et al.*, 2017). Nejčastějším histologickým typem LS asociovaného EC je podobně jako u sporadických případů endometroidní karcinom (Zhao *et al.*, 2022). Oproti sporadické formě se EC asociované s LS vyskytují častěji v nižších

částech dělohy, a to v 11-14 % případů, zatímco sporadických EC se v těchto oblastech vyskytuje v 1,8 % případů (Westin *et al.*, 2008, Masuda *et al.*, 2012).

1.5.3.2. Další kandidátní predispoziční geny

BRCA1 a *BRCA2* kódují proteiny účastníci se homologní rekombinace (kapitola 1.4.3.3). Jejich zárodečné mutace jsou známy zejména ve spojitosti s HBOC syndromem, ale případná spojitost s predispozicí ke vzniku EC je také předmětem výzkumu. Shu *et al.* ve studii 1083 nosiček mutací v *BRCA1/2* zjistili zvýšené riziko vzniku EC, zejména pak agresivního serózního (Shu *et al.*, 2016). Podobný výsledek byl popsán i v holandské studii, ve které bylo analyzováno 5980 nosiček zárodečných mutací v *BRCA1/2*. Nosičky mutací v *BRCA1* měly nejen vyšší riziko vzniku serózního typu EC (OR = 12,6), ale středně zvýšené riziko k EC obecně (OR = 3,5). Nosičky mutací v *BRCA2* oproti tomu měly celkové riziko EC o polovinu nižší (OR = 1,7) (de Jonge *et al.*, 2021). Jiné studie ovšem asociaci nosiček zárodečných mutací v genech *BRCA1/2* nepozorovaly (Kitson *et al.*, 2020, Lee *et al.*, 2017).

PTEN (OMIM #601728) je tumor supresorový gen, jehož proteinový produkt je zapojen do signálních drah PI3K/AKT a MAPK. V nádorové tkáni EC dochází k častým somatickým mutacím v *PTEN*. Ztráta funkce *PTEN* proteinu umožňuje zvýšenou proliferaci a rezistenci k indukci apoptózy (Spurdle *et al.*, 2017). Zárodečné mutace *PTEN* způsobují syndrom Cowdenové, který je charakterizovaný četnými hamartomy, zpravidla kůže, mucinózních membrán a střev. Syndrom Cowdenové rovněž predisponuje k mnohým nádorovým onemocněním, například karcinomům štítné žlázy, prsu a endometria (Tan *et al.*, 2012, Nieuwenhuis *et al.*, 2014). Nosiči zárodečných mutací v *PTEN* mají kumulativní riziko EC do 70 let mezi 19-28 % (Riegert-Johnson *et al.*, 2010, Tan *et al.*, 2012). Nejčastějším histologickým typem EC u nosičů zárodečných mutací v *PTEN* je endometroidní karcinom. Genetická predispozice ke vzniku EC je pro nosiče zárodečných mutací v *PTEN* mimo klinický fenotyp syndromu Cowdenové vzácná (Spurdle *et al.*, 2017).

POLE (OMIM #174762) a *POLD1* (OMIM #174761) kódují katalytické a opravné podjednotky DNA polymeráz δ a ϵ . Účastní se DNA replikace a oprav DNA. Šest studií provedlo analýzu zárodečných mutací u pacientů s kolorektálním karcinomem nebo u jedinců z rodin, kde se tento karcinom vyskytuje. Dohromady odhalily genetické varianty zasahující exonukleázové domény *POLE* (exony 9-14) a *POLD1* (exony 8-13), poškozující správnou funkci opravy chyb při replikaci. Mezi nalezené varianty patřily pro *POLD1*: c.947A>G, p.(Asp3161Gly); c.1421T>C, p.(Leu474Pro); c.1433G>A, p.(Ser478Asn) a pro

POLE: c.1089C>A, p.(Asn363Lys); c.1421T>C, p.(Leu424Val). Role somatických variant *POLE* je v EC dobře známa (kapitola 1.5.2). Jaký je ale vliv zárodečných variant v *POLE* a *POLD1* na vznik EC, ať už missense nebo trunkačních variant, zůstává stále nejasné. (Palles *et al.*, 2013, Valle *et al.*, 2014, Rohlin *et al.*, 2014, Elsayed *et al.*, 2015, Spier *et al.*, 2015, Bellido *et al.*, 2016).

STK11 je gen, jehož zárodečné mutace způsobují PJS (kapitola 1.4.3.2). Kromě PJS je spojen s vysokým rizikem vzniku PDAC, ale i se zvýšeným rizikem gynekologických nádorů. Celoživotní kumulativní riziko vzniku EC je u nosiček s PJS 9 %. Toto riziko je nicméně nižší než riziko spojené s LS, u nosiček zárodečných mutací v *STK11* tak není doporučeno klinické sledování EC, pouze v případě souběžného výskytu s karcinomy ovaria, cervixu či prsu (Banno *et al.*, 2013).

CHEK2 (OMIM #604373) je tumor supresorový gen kódující kinázu, která se účastní regulace buněčného cyklu, reparace DNA a kontroly apoptózy. Zárodečné mutace v tomto genu jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomů prsu a ovaria (Kleiblova *et al.*, 2019). Riziko vzniku EC u nosiček hereditárních *CHEK2* mutací bylo popsáno v nizozemské studii, která ukázala, že nosičky varianty c.1100del, p.(Thr367MetfsTer15) měly častější rodinnou anamnézu kolorektálního karcinomu a EC (de Jong *et al.*, 2005). V další studii ovšem asociace zárodečných mutací v *CHEK2* s EC nebyla potvrzena (Einarsdottir *et al.*, 2007). V současné době je zatím málo dat pro přesné určení rizika vzniku EC u nosiček zárodečných patogenních variant v genu *CHEK2* (Spurdle *et al.*, 2017).

MUTYH (OMIM #604933) je gen, jehož proteinový produkt se účastní BER reparační dráhy (kapitola 1.2.2). Podílí se tak na opravách oxidačního poškození DNA. *MUTYH* je spojen s autosomálně recesivní adenomatózní polypózou a kolorektálním karcinomem. Jeho monolalelické zárodečné mutace s sebou nesou nízké kumulativní riziko vzniku karcinomu kolorekta (7 % pro muže, 6 % pro ženy), ale bialelické mutace riziko zvyšují o jeden řád (75 % pro muže, 72 % pro ženy) (Win *et al.*, 2014). V současné době existuje pouze jedna studie, která poukazuje na možné zvýšení rizika EC u nosičů heterozygotních zárodečných mutací v *MUTYH* (Win *et al.*, 2011). Riziko pro nosiče bialelických mutací v *MUTYH* není známé, zapojení tohoto genu do kancerogeneze EC je tak nejasné (Spurdle *et al.*, 2017).

TP53 (OMIM #191170) je tumor supresorový gen, který kóduje protein p53, účastnící se regulace buněčného cyklu, apoptózy a DNA reparace. Somatická inaktivace

TP53 je častým jevem ve vývoji EC. Záródečné mutace v *TP53* způsobují Liúv-Fraumeniho syndrom a predisponují k řadě různých nádorů, včetně sarkomů a endometriálního leiomyosarkomu. I když EC není známou manifestací Lióva-Fraumeniho syndromu, existuje studie, která publikovala přítomnost zárodečných mutací v *TP53* u pacientů s raným EC (Nichols *et al.*, 2001).

Možné spojení dědičné predispozice u EC bylo navrženo u genů *AKT1*, *APC*, *ATM*, *BRIP1*, *FAN1*, *FANCC*, *KLLN*, *NBN*, *NRLH1*, *PALB2*, *PIK3CA*, *RAD51C*, *RINT1*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SEC23B* (Spurdle *et al.*, 2017).

2. Cíle práce

Genetické pozadí u nádorových onemocnění je vysoce heterogenní. Navíc, podíl genetické predispozice se u různých dědičných nádorových onemocnění liší a ve většině případů s kumulací nádorových onemocnění v rodině nebyla dosud dědičná komponenta objasněna.

Cílem práce bylo určení podílu genetické predispozice u pacientek/tů s karcinomem pankreatu a karcinomem endometria v České republice pomocí několika dílčích úkolů:

1. Stanovit frekvenci zárodečných patogenních variant ve známých nádorových predispozičních genech a v kandidátních genech, u nichž není asociace se zvýšeným rizikem vzniku daného karcinomu dosud popsána.
2. Určit rizika vzniku onemocnění spojená se zárodečnými patogenními variantami v jednotlivých genech.
3. Srovnat klinicko-patologické charakteristiky u nosičů zárodečných patogenních variant a pacientů bez mutací.
4. U pacientek s karcinomem endometria zhodnotit vliv indikačních kritérií ke genetickému testování na úspěšnost nalezení nosičů patogenních variant.

3. Metody

3.1. Soubor testovaných pacientů a kontrol

3.1.1. Soubor pacientů s PDAC

V rámci výzkumu zaměřujícího se na genetickou predispozici ke vzniku PDAC byla vyšetřena DNA od 226 pacientů s tímto onemocněním (tabulka 3). Studie probíhala retrospektivně a pacienti nebyli selektováni na základě žádných kritérií. Pacientům byl diagnostikován PDAC na Onkologické klinice VFN a do studie byli zařazeni mezi lety 2015 a 2018. Všichni pacienti poskytli informovaný souhlas s účastí na studii. Studie byla schválena Etickou komisí VFN. Všichni pacienti byli Češi kavkazské populace.

Tabulka 3. Klinicko-patologické charakteristiky souboru 226 pacientů s PDAC.

	Pacienti s PDAC N=226; (%)
Pohlaví	
Žena	109 (48,2)
Muž	117 (51,8)
Věk v době PDAC diagnózy	
Průměr (roky)	63
Medián (roky)	65
Rozmezí (roky)	40-85
<50 let	22 (9,7)
50-59 let	59 (26,1)
60-69 let	94 (41,6)
≥70 let	51 (22,6)
Mnohočetné nádory v osobní anamnéze	
Nepřítomny	209 (92,5)
Přítomny	17 (7,5)
Další nádory s osobní anamnéze	
BC	8 (3,5)
OC	3 (1,3)
Jiné	9 (4,0)
Rodinná nádorová anamnéza (první/druhý stupeň)	
Negativní	140 (62,2)
Pozitivní	85 (37,8)
Neznámá	1
Nádory v rodinné anamnéze	
PDAC	22 (9,7)
BC	32 (14,2)
OC	9 (4,0)
CRC	36 (15,9)
Melanom	4 (1,8)

BC – karcinom prsu, CRC – kolorektální karcinom, OC – ovariální karcinom, PDAC – karcinom pankreatu

3.1.2. Soubor pacientů s EC

Výzkum zaměřující se na analýzu dědičné predispozice k EC byl proveden na retrospektivní kohortě 527 pacientek. DNA pacientek byla k výzkumu poskytnuta devíti pracovišti v rámci konsorcia CZECANCA a Bankou biologického materiálu 1. LF UK (tabulka 4). Do studie byly zahrnuty pacientky s EC diagnostikovaným mezi lety 2011-2021. Všechny pacientky poskytly informovaný souhlas s účastí na studii. Studie byla schválena Etickou komisí VFN. Všechny pacientky byly Češky kavkazské populace.

Tabulka 4. Seznam center, které poskytly DNA vzorky pacientek s EC

Centrum	Počet pacientek
Banka biologického materiálu, 1. LF UK, Praha	235
Centrum lékařské genetiky a reprodukční medicíny GENNET, Praha	140
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN, Praha	51
Oddělení epidemiologie a nádorové genetiky, Masarykův onkologický ústav, Brno	29
Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN, Praha	25
Ústav lékařské genetiky, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc	16
Oddělení lékařské genetiky, Laboratoře AGEL, Nový Jičín	15
Ústav lékařské genetiky, Lékařská fakulta v Plzni UK a Fakultní nemocnice Plzeň, Plzeň	10
Oddělení lékařské genetiky, GHC Genetics, Praha	4
Oddělení lékařské genetiky, Pronatal, Praha	2

Převažujícím typem nádoru těla děložního (tabulka 5) byl karcinom endometria (89,7 %), celý soubor tak bude dále nazýván jako soubor pacientek s EC.

Pacientky s EC byly zařazeny do studie na základě různých kritérií. Část pacientek byla indikována ke genetickému vyšetření (hlavně vzorky z konsorcia CZECANCA), zatímco zbylé pacientky byly neselektované (zejména pacientky z Banky biologického materiálu). Pacientky byly rozděleny do skupin na základě indikačních kritérií ke genetickému testování na HBOC a LS. Tato kritéria jsou platná v České republice a vycházejí z doporučení NCCN (verze 1.2022, kapitoly 3.1.2.1 a 3.1.2.2) (Foretova *et al.*, 2019, Plevova *et al.*, 2009).

Tabulka 5. Klinicko-patologické charakteristiky souboru 527 pacientek s EC.

	Všechny EC pacientky N=527; (%)	Charakteristika na základě splnění indikačních kritérií			
		Pouze LS N=151; (%)	Pouze HBOC N=16; (%)	LS+HBOC N=82; (%)	Neindikované N=278; (%)
Věk v době EC diagnózy					
Průměr (roky)	59,1	50,8	59,0	51,3	65,8
Medián (roky)	60,5	47,8	57,0	49,0	65,3
Rozmezí (roky)	24-92	24-91	51-73	28,9-81,5	50-92
<50 let	120 (23,2)	79 (53,4)	0	41 (51,3)	0
>=50 let	397 (76,8)	69 (46,6)	15 (100,0)	39 (48,8)	274 (100,0)
Nedostupné	10	3	1	2	4
Histologické děložních malignit					
Karcinom endometria	349 (89,7)	76 (85,4)	8 (72,7)	48 (100,0)	217 (90,0)
Endometroidní adenokarcinom	284 (73,0)	65 (73,0)	7 (63,6)	44 (91,7)	168 (69,7)
Serózní	35 (9,0)	4 (4,5)	1 (9,1)	3 (6,3)	27 (11,2)
Světlobuněčný	7 (1,8)	2 (2,2)	0	0	5 (2,1)
Nediferencovaný	3 (0,8)	0	0	0	3 (1,2)
Smišený (endometroidní/serózní)	3 (0,8)	0	0	0	3 (1,2)
Smišený (endometroidní/serózní/světlobuněčný)	1 (0,3)	1 (1,1)	0	0	0
Smišený (endometroidní/světlobuněčný)	4 (1,0)	3 (3,4)	0	0	1 (0,4)
EIN	8 (2,1)	1 (1,1)	0	1 (2,1)	6 (2,5)
Nedostupné	4 (1,0)	0	0	0	4 (1,7)
Sarkomy	40 (10,3)	13 (14,6)	3 (27,3)	0	24 (10,0)
Leiomyosarkom	32 (8,2)	9 (10,1)	2 (18,2)	0	21 (8,7)
Nediferencovaný	2 (0,5)	0	0	0	2 (0,8)
Endometriální stromální sarkom	3 (0,8)	2 (2,2)	0	0	1 (0,4)
Nedostupné	3 (0,8)	2 (2,2)	1 (9,1)	0	0
Bliže neurčený maligní nádor těla děložního	138	62	5	34	37
FIGO grade					
1	123 (35,9)	35 (48,6)	4 (40,0)	16 (45,7)	68 (30,1)
2	100 (29,2)	15 (20,8)	3 (30,0)	12 (34,3)	70 (31,0)
3	120 (35,0)	22 (30,6)	3 (30,0)	7 (20)	88 (38,9)
Nedostupné	184	79	6	47	52
FIGO stadium					
0	8 (2,8)	1 (2,1)	0	1 (4,2)	6 (2,8)
I	176 (60,9)	33 (68,8)	4 (66,7)	17 (70,8)	122 (57,8)
II	38 (13,1)	5 (10,4)	1 (16,7)	2 (8,3)	30 (14,2)
III	48 (16,6)	8 (16,7)	1 (16,7)	2 (8,3)	37 (17,5)
IV	19 (6,6)	1 (2,1)	0	2 (8,3)	16 (7,6)
Nedostupné	238	103	10	58	67
Mnohočetné nádory v osobní anamnéze					
Přítomny	214 (40,6)	69 (45,7)	16 (100,0)	82 (100,0)	47 (16,9)
Nepřítomny	313 (59,4)	82 (54,3)	0	0	231 (83,1)
Další nádory v osobní anamnéze					
CRC	31 (5,9)	31 (20,5)	0	0	0
OC	59 (11,2)	0	1 (6,3)	58 (70,7)	0
BC	80 (15,2)	14 (9,3)	15 (93,8)	13 (15,9)	38 (13,7)
Tri nádory EC+(BC/OC/CRC)	13 (2,5)	2 (1,3)	0	11 (13,4)	0
Jiné	31 (5,9)	22 (14,6)	0	0	9 (3,2)
Žádné	313 (59,4)	82 (54,3)	0	0	231 (83,1)
Rodinná nádorová anamnéza (první/druhý stupeň)					
Pozitivní	353 (69,8)	120 (81,6)	13 (100,0)	56 (73,7)	164 (60,7)
Negativní	153 (30,2)	27 (18,4)	0	20 (26,3)	106 (39,3)
Neznámá	21	4	3	6	8
Nádory v rodinné anamnéze					
EC	35 (6,9)	14 (9,5)	1 (7,7)	6 (7,9)	14 (5,2)
CRC	88 (17,4)	39 (26,5)	4 (30,8)	15 (19,7)	30 (11,1)
OC	15 (3,0)	7 (4,8)	1 (7,7)	5 (6,6)	2 (0,7)
BC	60 (11,9)	14 (9,5)	3 (23,1)	9 (11,8)	34 (12,6)
Mnohočetné (EC/OC/CRC)	10 (2,0)	10 (6,8)	0	0	0
Jiné	145 (28,7)	36 (24,5)	4 (30,8)	21 (27,6)	84 (31,1)
Žádné	153 (30,2)	27 (18,4)	0	20 (26,3)	106 (39,3)
Neznámé	21	4	3	6	8

BC – karcinom prsu, CRC – kolorektální karcinom, N – počet, OC – ovariální karcinom, EIN – endometriální interepitheliální neoplázie.

Procenta byla vypočítána z celkového počtu pacientů se známými charakteristikami.

3.1.2.1. Indikační kritéria ke genetickému testování – karcinom prsu (C50) a karcinom ovaria (C56)

- Osobní nádorová anamnéza
 - Pacientka s C50 je mladší 45 let, nebo mladší 50 let, není-li známa rodinná nádorová anamnéza.
 - Pacientka má bilaterální C50, kdy pacientka vyvinula první C50 dříve než v 50 letech a oba dříve než v 60 letech.
 - Pacientka byla diagnostikována s triple negativním C50 ve věku pod 60 let.
 - Pacient je muž s C50.
 - Pacientka byla diagnostikována buď s C56, blíže neurčeným karcinomem ženských pohlavních orgánů (C57), nebo s karcinomem peritonea (C48.2).
 - Pacientce byla diagnostikována duplicita C50 a karcinomu pankreatu (C25) v jakémkoliv věku.
- Rodinná nádorová anamnéza
 - Pacientka a další dva příbuzní byli diagnostikováni s C50.
 - Pacientka a další příbuzný byli diagnostikováni s C50, kdy alespoň jeden je mladší 50 let nebo oba mladší 60 let (včetně pacientky).
 - Pacientka a přímý příbuzný (rodič, sourozenec, potomek, případně sestra matky/otce) byli diagnostikováni s:
 - C56, karcinomem vejcovodu nebo primárním peritoneálním tumorem;
 - Triple negativním C50 nebo medulárním C50;
 - Karcinomem pankreatu nebo prostaty $GS \geq 7$ nebo primárně metastatický karcinom prostaty.

3.1.2.2. Indikační kritéria ke genetickému testování – kolorektální karcinom (C18) a karcinom endometria (C54)

- Pacientovi byl diagnostikován tumor ve věku pod 50 let.
- U pacienta byla potvrzena mikrosatelitová nestabilita ve věku pod 60 let.
- Pacient má souběžnou diagnózu spojenou LS (karcinom kolorekta, žaludku, pankreatu, ovaria, tenkého střeva, močového měchýře, ledvinové pánvičky, žlučovodu, glioblastom).

- Pacient a jeden přímý příbuzný mají diagnózu spojenou s LS ve věku pod 50 let.
- Pacient a dva druhostupňoví příbuzní mají diagnózu spojenou s LS v jakémkoliv věku.
- Pacient s kolorektálním karcinomem a více než 10 adenomy/polypy.

3.1.3. Soubor kontrol

V rámci studie byly použity dva soubory populačně specifických kontrol (PMC – population-matched controls). Prvním z nich byl soubor 777 jedinců (89 mužů, 688 žen) starších 60 let bez pozitivní osobní nádorové anamnézy a bez pozitivní rodinné nádorové anamnézy u příbuzných prvního stupně. Druhým souborem bylo 1662 neselektovaných kontrol (1170 mužů, 492 žen) s mediánem věku 57 let (18-88 let) vyšetřených celoexomovým sekvenováním Národním centrem pro lékařskou genomiku (<https://ncmg.cz>). Tyto kontroly nebyly vyšetřovány z důvodu nádorového onemocnění. Jedinci v kontrolách byli Češi kavkazské populace. Všichni zúčastnění podepsali informovaný souhlas se studií.

3.2. Izolace DNA z periferní krve

DNA byla izolována z leukocytů periferní krve za použití kitu Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). K izolaci byly použity 3 ml promíchané krve. Nejprve byly lyzovány erytrocyty pomocí 9 ml hypotonického Cell Lysis Solution. Po centrifugaci byly k peletě zbylých krevních elementů přidány 3 ml Nuclei Lysis Solution a 1 ml Protein Precipitation Solution. Vysrážené proteiny byly z roztoku odstraněny centrifugací a supernatant byl přidán ke 4 ml čistého isopropanolu. Po vysrážení a centrifugaci byla peleta DNA promyta 3 ml 70% ethanolu a vysušena. Následně byla rozpuštěna v Tris-EDTA pufru (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) a naředěna na konečnou koncentraci 100 ng/μl.

3.3. Sekvenování nové generace

3.3.1. Sekvenační panel CZECANCA

Analýza vzorků genomové DNA byla prováděna panelovým sekvenováním nové generace (NGS). Byl použit panel CZECANCA v1.2.2, navržený v rámci Laboratoře onkogenetiky pomocí programu HyperDesign (KAPA HyperChoice, Roche). Panel

CZECANCA v1.2.2 cílí na 226 známých a kandidátních nádorových predispozičních genů (příloha 1) (Soukupova *et al.*, 2018). Celková velikost cílové oblasti panelu CZECANCA byla 632 230 bp. Většina proteinových produktů cílových genů se podílí na DNA reparačních procesech, nebo jsou součástí proliferačních a kontrolních signálních kaskád.

3.3.2. Příprava NGS knihovny

Příprava genomové DNA pro vytvoření NGS knihovny se skládá z následujících kroků: fragmentace DNA, enzymatické úpravy vzniklých fragmentů, ligace adaptorových sekvencí, inkorporace specifických indexovacích sekvencí pomocí PCR, nabohacení cílové sekvence panelu a konečná amplifikace pomocí PCR.

Pro přípravu knihovny před nabohacením cílové sekvence byl použit komerční kit KAPA HyperPlus (Roche). Reagencie tohoto kitu byly používány v polovičním množství oproti doporučení výrobce (výjimkou byla KAPA HiFi HotStart ReadyMix). Pro hybridizaci s panelem a následné omývání byly použity kity KAPA HyperCapture Reagent a KAPA HyperCapture Bead (Roche). Pro stanovení rozsahu velikosti fragmentů byl použit Bioanalyzer 2100 (High Sensitivity kit, Agilent Technologies). Koncentrace DNA byla stanovena pomocí fluorimetrů Qubit 3 a Qubit Flex za použití kitu High Sensitivity (Invitrogen).

3.3.2.1. Fragmentace genomové DNA

Cílem fragmentace genomové DNA za účely NGS je získat fragmenty DNA o střední velikosti 200 bp. Pro fragmentaci bylo použito 100 ng genomové DNA od každého vzorku. DNA byla naředěna deionizovanou vodou do objemu 15 μ l. Fragmentace probíhala enzymaticky za použití směsi restričních endonukleáz, obecně nazývaných jako fragmentáza, dodávaných v kitu KAPA HyperPlus. Enzymatická aktivita fragmentázy je citlivá na přítomnost EDTA v rehydratačním roztoku pro rozpuštění izolované DNA. Podle koncentrace EDTA v konečném objemu fragmentačního mixu ($V = 25 \mu$ l), bylo k 15 μ l přidáváno 2,5 μ l naředěného Conditioning Solution, který slouží k zamezení vlivu EDTA na funkci fragmentázy. Tabulka ředění koncentrovaného Condition Solution se nachází v tabulce 6.

Tabulka 6. Tabulka ředění Conditioning Solution v závislosti na koncentraci EDTA v reakční směsi. Ředění je počítáno pro konečný objem 100 μ l.

Konečná koncentrace EDTA v 25 μl reakční směsi [mM]	Ředicí faktor	Objem koncentrátu Condition Solution [μl]	Objem deionizované vody [μl]
0,02 - 0,05	32	3,1	96,9
0,1	15,4	6,5	93,5
0,2	7,4	13,5	86,5
0,3	4,8	21	79
0,4	3,3	30	70
0,5	2,6	18,8	81,2
0,6	2,2	46,5	53,5
0,7	1,8	56	44
0,8	1,6	64	36
0,9	1,4	72	28
1,0	1,3	80	20

Vzorky genomové DNA, které neobsahovaly EDTA, byly ředěny deionizovanou vodou přímo na objem 17,5 μ l. Vzorky byly chlazeny na 4°C, než k nim bylo přidáno 7,5 μ l roztoku fragmentázy, získaného smícháním koncentrovaného roztoku fragmentázy a fragmentázového pufru dle poměru daného výrobcem. Vzniklá reakční směs byla umístěna do termocycleru, kde proběhla fragmentace při 37°C po dobu 12,5 min.

3.3.2.2. Úpravy fragmentované DNA

Dvouřetězcové fragmenty DNA vzniklé v předchozím kroku obsahují konce s jednořetězcovými přesahy. Zarovnání konců bylo prováděno v procesu DNA End Repair. Na 3' konce takto upravených DNA řetězců bylo následně připojeno dAMP v procesu nazývaném A-tailing. Tento krok je zásadní pro nadcházející ligaci adaptorových sekvencí k fragmentované DNA. Procesy End Repair a A-tailing probíhaly souběžně.

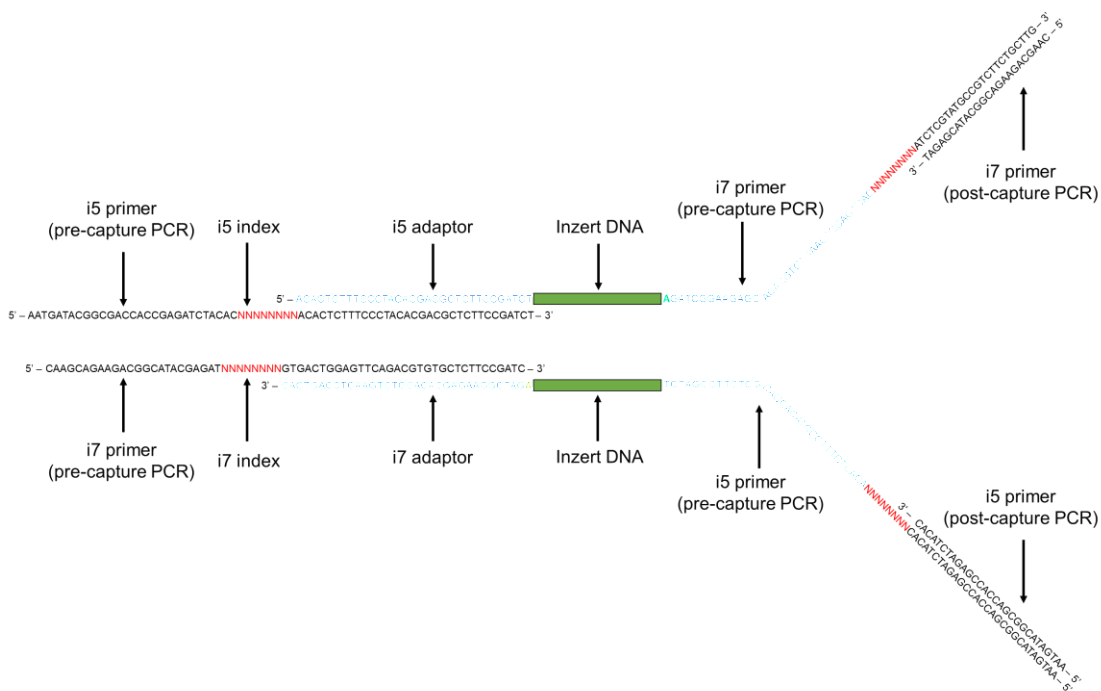
K chlazené fragmentační směsi bylo přidáno 5 μ l roztoku enzymů pro End Repair a A-tailing připravených dle poměrů udávaných výrobcem. Reakční směs byla umístěna do termocycleru při teplotě 65°C po dobu 30 min. Během tohoto kroku dochází k tepelné denaturaci fragmentázy.

Adaptorové oligonukleotidy byly vyrobeny na zakázku (GeneriBiotech). Jedná se o dva řetězce (33 bp), které obsahují vzájemně komplementární části, umožňující částečnou hybridizaci. Výsledkem je vidlicovitý útvar (obrázek 9), který je ligován na fragmentovanou

DNA a který následně slouží pro specifickou hybridizaci s primery nesoucími identifikační sekvence.

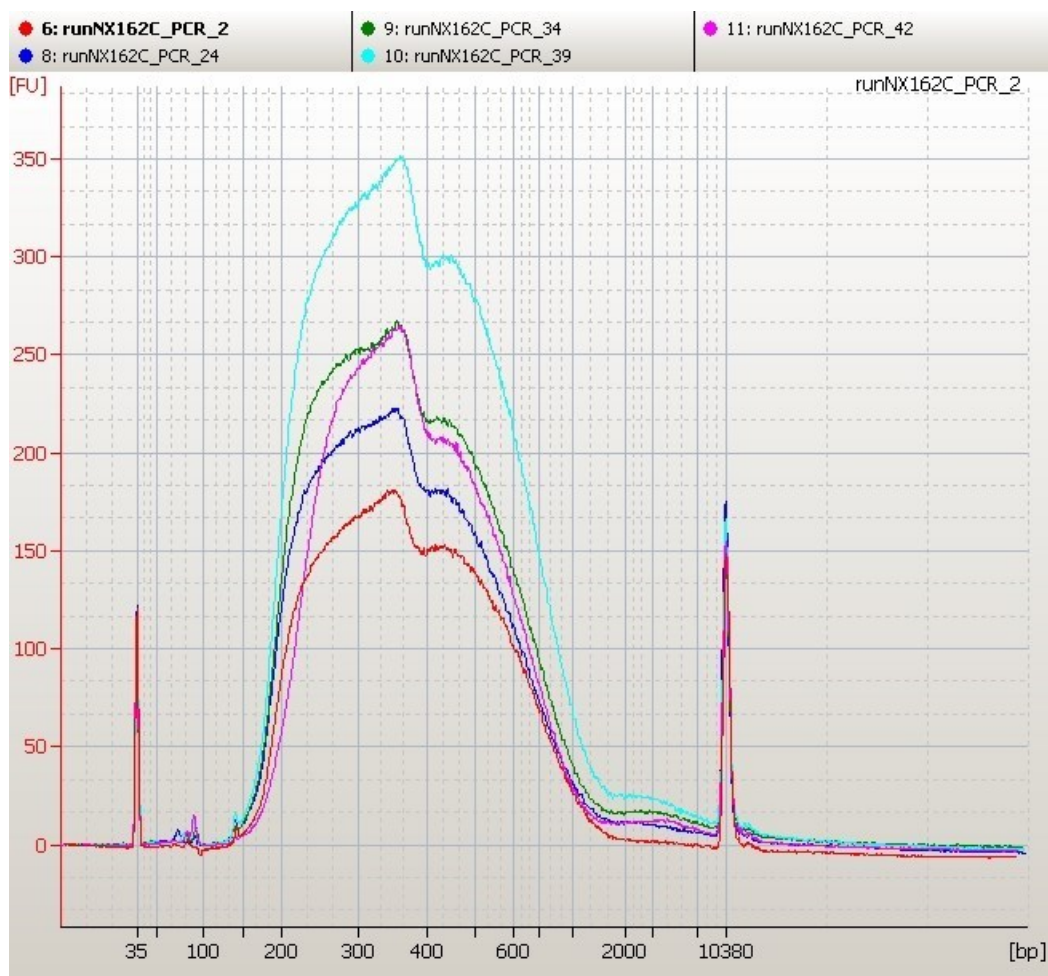
i5 adaptor 5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T-3'
 i7 adaptor 5'-pGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-3'
 *fosfotiolátová vazba

Adaptory byly připravovány pomocí touchdown hybridizace. Za tímto účelem byly smíchány spolu s Tris-NaCl pufrům na koncentraci 40µM obou adaptorových řetězců a 10mM Tris-HCl, 10mM NaCl. Směs adaptorů byla hybridizována v termocycleru při programu: 97°C/2 min, 72×(97°C/1 min (-1°C per cyklus)), 25°C/ 5min. Po hybridizaci byla směs adaptorů naředěna Tris-NaCl pufrům a deionizovanou vodou na konečnou koncentraci 15 µM hybridizovaných adaptorů v 1mM Tris-HCl, 1mM NaCl.



Obrázek 9. Schematické znázornění úpravy fragmentované DNA (inzert, zelený obdélník) během přípravy knihovny. Modré sekvence odpovídají adaptorovým sekvencím (i5 a i7). Částečná komplementarita i5 a i7 adaptorů vytváří vidlicovou strukturu. K adaptorovým sekvencím jsou částečně komplementární primery pro pre-capture PCR (levá část schématu). Tyto primery nesou sekvenci 8 oligonukleotidů (index, červeně), které umožňují identifikaci vzorku po sekvenaci. Během pre-capture PCR se sekvence primerů připojují k inzertu (znázorněno v pravé části). Ke koncovým částem pre-capture PCR primerů jsou komplementární primery pro post-capture PCR.

Po ligaci adaptorů byly vzorky purifikovány pomocí magnetických kuliček SPRI. Po přečištění magnetickými kuličkami byly fragmenty DNA amplifikovány pomocí PCR (tzv. pre-capture PCR), kde byly jako primery využity oligonukleotidy mající počáteční část komplementární k jednomu z vláken adaptorů. Za touto komplementární částí se nachází variabilní sekvence osmi nukleotidů zvaná index či barcode (obrázek 9). Kombinací indexů forward a reverse primerů dochází k unikátní identifikaci vzorku, což umožňuje sekvenaci více vzorků najednou. Primery pro pre-capture PCR rovněž na svém konci obsahují univerzální sekvence pro hybridizaci na sekvenační flow cell. Pre-capture PCR probíhala za použití enzymu KAPA HiFi HotStart ReadyMix v termocycleru při následujícím programu: 98°C/45 s, 4×(98 °C/15 s, 60 °C/30 s, 72 °C/30 s), 72°C/1 min.



Obrázek 10. Kontrola rozložení velikosti fragmentů DNA knihovny po pre-capture PCR na Bioanalyzeru 2100. Na ose x je vynesena velikost fragmentů DNA (bp), na ose y síla signálu.

Po skončení pre-capture PCR byla DNA přečištěna pomocí magnetických kuliček SPRI a eluována do 30 µl deionizované vody. Následně bylo u všech vzorků provedeno stanovení koncentrace DNA pomocí fluorimetru Qubit a u náhodně vybraných vzorků bylo určeno rozložení velikosti fragmentů na Bioanalyzeru 2100. Jako vhodný byl brán medián velikosti fragmentů 350-400 bp (obrázek 10).

i5 primer	5'–AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACNNNNNNNNN
(pre-capture PCR)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T–3'
i7 primer	5'–CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNNNNNN
(pre-capture PCR)	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC–3'

*fosfothiolátová vazba

3.3.2.3. Nabohacení cílové sekvence

Vzorky byly smíchány ve stejném hmotnostním poměru do celkového množství 1,5 µg DNA. Pro minimální sekvenační pokrytí 100× na platformě NextSeq bylo možné smíchat až 144 vzorků. K poolu vzorků bylo přidáno 20 µl COT DNA (KAPA HyperCapture Reagent kit, Roche), která slouží ke snížení nespecifické hybridizace v repetitivních sekvencích. Požadovaný objem poolu s COT DNA byl 65 µl. Pokud byl objem větší, byla použita rotační vakuová odparka SpeedVac (Eppendorf).

K poolu byl přidán dvojnásobný ($V = 130 \mu\text{l}$) objem magnetických kuliček HyperPure (KAPA HyperCapture Beads kit, Roche), pomocí kterých byl přečištěn. DNA byla z kuliček eluována do 13,4 µl univerzálních blokovacích oligonukleotidů (Universal Enhancing Oligos), které slouží k zakrytí sekvence adaptorů, indexů a univerzálních primerů, aby nedocházelo k jejich hybridizaci se sondami panelu. K poolu byly následně přidány hybridizační pufrý (Hybridization Buffer $V = 28 \mu\text{l}$, Hybridization Component H $V = 12 \mu\text{l}$) a celý objem byl doplněn deionizovanou vodou do 56,4 µl. Veškerý objem bez magnetických kuliček byl přidán k 4 µl alikvotu sond sekvenačního panelu CZECANCA. DNA s panelem byla denaturována v termocycleru při 95°C 5 min a inkubována 16-20 hodin při 55°C. V tomto kroku dochází k hybridizaci sond panelu s cílovou sekvencí analyzované DNA pro nabohacení fragmentů obsahujících sekvence vyšetřovaných genů.

Po skončení hybridizace byly k sekvenačnímu panelu přidány magnetické kuličky s navázaným streptavidinem (KAPA HyperCapture Beads kit, Roche). Na hybridizační sondy panelu je navázána biotinová značka, která tvoří se streptavidinem silnou nekovalentní vazbu, umožňující fyzické vychytání cílové sekvence z roztoku. Magnetické

kuličky s cílovou sekvencí byly omyty sérií pufrů nahřátých na 55°C a pufrů o laboratorní teplotě, během nichž byly odstraněny všechny DNA sekvence mimo cílovou. Cílová DNA byla následně amplifikována pomocí post-capture PCR: 98°C/45s, 11×(98°C/15s, 60°C/40s, 72°C/30s), 72°C/1 min. Jako primery byly použity oligonukleotidy komplementární ke koncové části primerů začleněných k fragmentované DNA během pre-capture PCR (obrázek 9).

i5 primer
(post-capture PCR) 5'–AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC–3'
i7 primer
(post-capture PCR) 5'–CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT–3'

Výsledná knihovna byla přečištěna pomocí magnetických kuliček HyperPure a eluována do 40 µl deionizované vody. U knihovny byla stanovena její koncentrace pomocí fluorimetru Qubit (typické rozmezí 3-4 ng/µl). Před sekvenací na platformě NextSeq500 byla knihovna denaturována pomocí 200mM NaOH a naředěna HT1 puftrem (NextSeq kit, Illumina) na konečnou koncentraci 1,5 pM. Knihovna byla sekvenována za použití kitu NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 150 cyklů (Illumina).

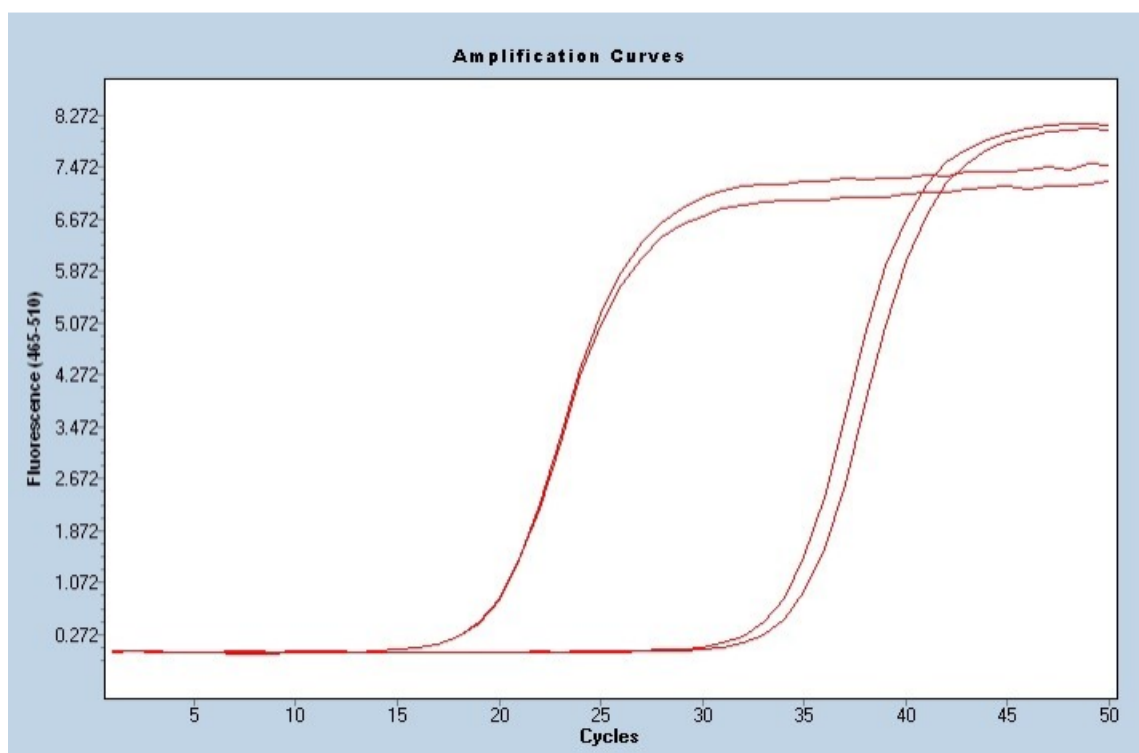
3.3.3. Kontrola nabohacení

Kvalita nabohacení NGS knihovny byla kontrolována pomocí kvantitativní PCR (qPCR). Bylo použito celkem 8 párů primerů cílících na různé geny (tabulka 7). Pět párů primerů nasedalo na oblasti genů, které jsou mezi cílovými geny panelu CZECANCA (*ATM*, *BRC1A1*, *MSH6*, *PALB2*, *RAD51C*), zatímco tři (intron *DPYD*, *TRPM1*, *TYR*) nasedaly mimo oblast panelu. Správný průběh nabohacení cílových genů se měřil podle rozdílu počtu cyklů, v nichž PCR cílových a necílových oblastí překročila fluorescenční práh, společně s porovnáním s kontrolní knihovnou (obrázek 11).

Vzorek konečné knihovny byl naředěn na koncentraci 1 ng/µl a spolu s kontrolní knihovnou byl amplifikován na program: 95°C/12 min; 50×(95°C/15 s; 60°C/25 s; 72°C/15 s); 95°C/5 s; 72°C →95°C; 40°C/10 s. Reakce qPCR byla prováděna za použití kitu HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis Biodyne) na přístroji Light Cycler 480 (Roche).

Tabulka 7. Primery použité pro kontrolu nabohacení cílové sekvence panelu CZEKANCA.

Gen	Název primeru	Sekvence (5'– 3')	Amplikon (bp)
<i>ATM</i>	ATM_11F	GATCGTGCTGTTCCACTCC	190
	ATM_11R1	CTTCCTTTTGAAGGGACACTG	
<i>BRCA1</i>	BRCA1_11FF	ACCACAGTCGGGAAACAAGC	152
	BRCA1_11ER	GTGGGCAGAGAATGTTGCAC	
<i>MSH6</i>	MSH6_4BF	AGAGTGAAGGCCTGAACAGC	204
	MSH6_4R	CACTAACGTGGGCTTGGGAT	
<i>PALB2</i>	PALB2_6F	AGTGGGTAATGCAGGCAGA	181
	PALB2_6R	CATATGTAAGACACGAGACACTGG	
<i>RAD51C</i>	RAD51C_7F	ACCAAGTCAGTAAGGCCATATAC	195
	RAD51C_7R	CACAGGACTAGCTCTAAGAAACC	
<i>DPYD</i>	DPYD49	CACTCAGCATCAGCCACATATC	212
	DPYD50	TGAGGGACAACCTGGTTTATCAAGC	
<i>TRPM1</i>	TRPM1_8F	GTCTCTGTGGTCATTTTGTAAACAACACC	200
	TRPM1_8R	CCAACATCAGAGGGACAGGAGTC	
<i>TYR</i>	TYR_3F	GGAAGTATTCACTTTGCACCAGATC	220
	TYR_3R	GATTTTGAACCTGAGTAGAACTTGGC	

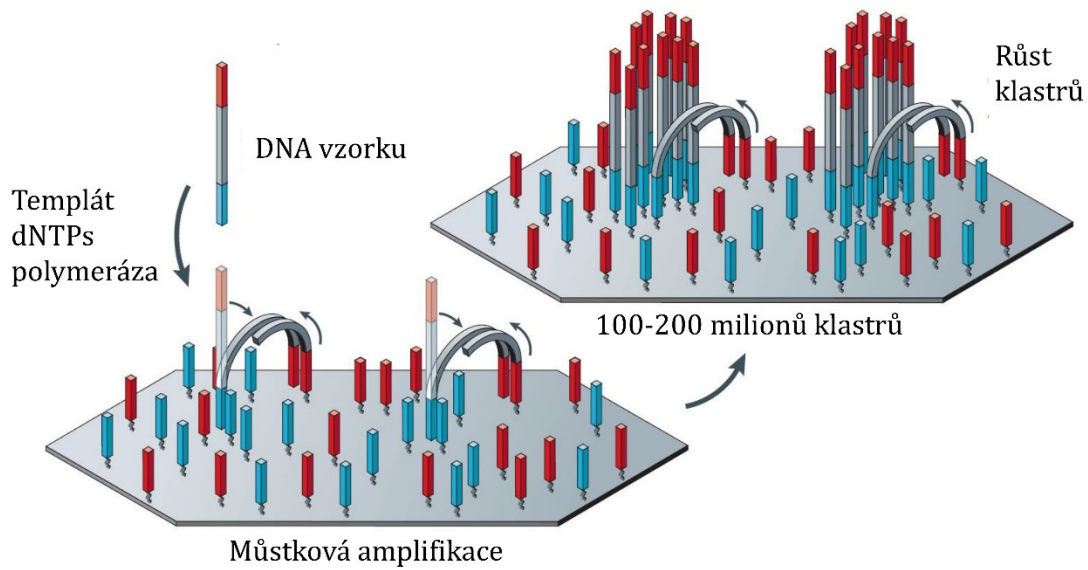


Obrázek 11. Schematické znázornění kontroly nabohacení cílové sekvence panelu. Osa x značí číslo cyklu PCR, osa y míru fluorescenčního signálu. Vlevo se nacházejí fluorescenční křivky pro gen v cílové oblasti panelu CZEKANCA (primery PALB2_6F/R), zatímco vpravo křivka genu, který se nenachází v cílové oblasti (primery TRPM1_8F/R). Cyklus překročení fluorescenčního prahu u cílových oblastí panelu CZEKANCA je u analyzované knihovny porovnáván s kontrolní knihovnou.

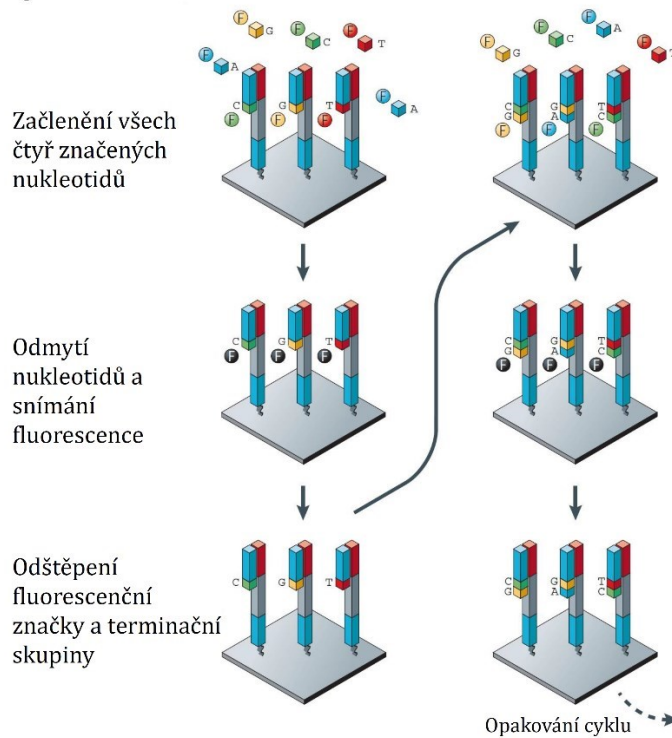
3.3.4. Illumina sekvenování

Sekvenování bylo prováděno na platformě NextSeq500 (Illumina). Technologie Illumina sekvenování využívá tzv. sekvenaci syntézou za použití reverzibilně terminačních nukleotidů, které jsou fluorescenčně značené. Sekvence probíhá na sklíčku (flow cell), které je pokryté pevně ukotvenými oligonukleotidy sloužícími jako primery pro pozdější můstkovou amplifikaci. Oligonukleotidy jsou komplementární k sekvenci vnesené k fragmentům DNA během přípravy knihovny. Molekuly knihovny náhodně hybridizují s oligonukleotidy na flow cell. K navázané DNA je poté dosyntetizováno komplementární vlákno, kdy DNA polymeráza využívá oligonukleotidy na flow cell coby primery. Vzniklý komplementární řetězec je tak ukotven k povrchu flow cell. V dalších krocích dochází k tzv. „můstkové PCR“, během níž se navázaná vlákna DNA ohýbají k dalším oligonukleotidům na povrchu flow cell (tvoří můstky) a DNA polymeráza dosyntetizovává komplementární řetězec (obrázek 12A). Vzniklý můstek je poté denaturován. Takto vznikají takzvané klastry, neboli oblasti obsahující konkrétní namnoženou sekvenci. Před samotnou sekvenací dochází k denaturaci za vzniku jednořetězcových DNA. Sekvenování probíhá pomocí nově přidaných univerzálních primerů, DNA polymerázy a čtyř typů fluorescenčně značených nukleotidů, každý s odlišnou fluorescenční značkou. Sekvence se odehrává v cyklech, během nichž je do nově vznikajícího řetězce začleněn a detekován vždy jen jeden nukleotid. Po odmytí nezačleněných nukleotidů dochází k laserové excitaci fluoroforu a snímání signálu kamerou. Poté jsou odštěpeny fluorescenční značky a terminátory inkorporovaných nukleotidů, čímž je umožněno provést nový sekvenační cyklus (obrázek 12B). Získaný signál je zapisován do sekvence a bioinformaticky zpracováván (Metzker, 2010, Bentley *et al.*, 2008).

A) Amplifikace sekvence



B) Sekvence



Obrázek 12. Princip technologie Illumina sekvenování. A) Můstková PCR sloužící k vytvoření klastru sekvenované DNA. B) Průběh sekvenace pomocí fluorescenčně značených nukleotidů s odstranitelnou 3' terminační skupinou. Převzato a upraveno z (Metzker, 2010).

3.4. Bioinformatické zpracování

Výsledkem sekvenace na platformě NextSeq500 (Illumina) jsou textová data ve formátu FASTQ. Kvalita čtení bází byla kontrolována pomocí FastQC v0.11.2. Sekvenační data byla následně mapována na referenční genom hg19 za použití programu Novoalign v2.08.03, čímž byly vytvořeny soubory formátu SAM, které byly pomocí nástroje Picard tools v1.129 přeměněny na binární formu BAM. Kvalita bází namapovaných na referenční genom byla kontrolována pomocí softwaru Genome Analysis Toolkit (GATK) v3.8.1. BAM soubory byly následovně zpracovány GATK pipeline na variant-call formát (VCF) a anotovány pomocí SnpEff 4.3 nástroje. Pro vizualizaci sekvenačních dat v BAM formátu bylo použito IGV (Integrative Genomics Viewer). Středně dlouhé inserce a delece byly hodnoceny pomocí softwaru Pindel 0.2.5a7. Analýza velkých genomových přestaveb (CNV; copy number variation) byla provedena nástrojem CNVkit 0.7.4.

3.5. Analýza dat

3.5.1. Skupiny genů – karcinom pankreatu

V rámci studie dědičné predispozice k PDAC bylo cílových 226 genů panelu CZECANCA rozděleno na skupinu 11 hlavních predispozičních genů (*STK11*, *CDKN2A*, *BRCA2*, *BRCA1*, *ATM*, *PALB2*, *TP53*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) (Llach *et al.*, 2020) a 215 ostatních kandidátních predispozičních genů.

3.5.2. Skupiny genů – karcinom endometria

V rámci studie dědičné predispozice k EC bylo cílových 226 genů panelu CZECANCA rozděleno na skupinu 19 hlavních predispozičních genů a 207 ostatních kandidátních genů. Mezi predispoziční geny patřilo pět genů predisponujících k LS (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*) a 14 genů spojených s HBOC (*ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*). Mezi ostatní kandidátní geny patřily geny, jejichž asociace s EC je neznámá či nejasná (např. *MUTYH*, *NBN*, *POLD1*, *POLE*) (Spurdle *et al.*, 2017).

3.5.3. Prioritizace variant

Během prioritizace nalezených genetických variant byly vyřazeny všechny varianty, které splňovaly následující podmínky:

- Nízká sekvenační kvalita ($q < 150$);
- Vysoká alelická frekvence (minor allele frequency, $MAF > 0.001$) v populačních databázích (gnomAD, Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project). Výjimkou byly varianty klasifikované jako patogenní/pravděpodobně patogenní (P/LP) v databázi ClinVar;
- Více jak 3 výskyty ve skupině 777 populačních kontrol. Výjimkou byly varianty klasifikované jako P/LP v ClinVar databázi;
- Přítomnost v UTR, intronech mimo konsenzní sestřihová místa, synonymní varianty a inserce/delece nezpůsobující posun čtecího rámce. Výjimkou byly varianty klasifikované jako P/LP v ClinVar databázi;
- Klasifikace jako benigní/pravděpodobně benigní (B/LB) v ClinVar databázi s alespoň dvouhvězdičkovým ohodnocením;
- Známé nízké riziko: *BRCA2* (c.9976A>T; p.Lys3326Ter) a *CHEK2* (c.470T>C; p.Ile157Thr).

Výsledný soubor variant byl vyhodnocen podle doporučení ACMG (Miller *et al.*, 2021). Varianty v ClinVar databázi uvedené s pouze jedním přispěvatelem nebo s rozporuplnou interpretací patogenity byly považovány za varianty nejasného významu (VUS). Duplikace celých genů a trunkační varianty postihující poslední exon byly považovány za VUS, pokud nebyly klasifikovány jako P/LP v ClinVar databázi. Přítomnost všech patogenních variant byla zkontrolována v IGV nebo potvrzena metodou Sangerova sekvenování či MLPA (kapitola 3.6).

3.5.4. Statistické zpracování

Frekvence zárodečných patogenních variant u pacientů a kontrol byla porovnáována pomocí Fisherova přesného testu nebo Pearsonova χ^2 testu. Rozdíl ve věku diagnóz u pacientů s EC byl spočítán pomocí jednofaktorové ANOVA analýzy následované Tukey-Kramerovým testem. Statistické testy byly oboustranné a p hodnoty $< 0,05$ byly považovány za signifikantní. Analýza přežití byla provedena Kaplan-Meierovou metodou.

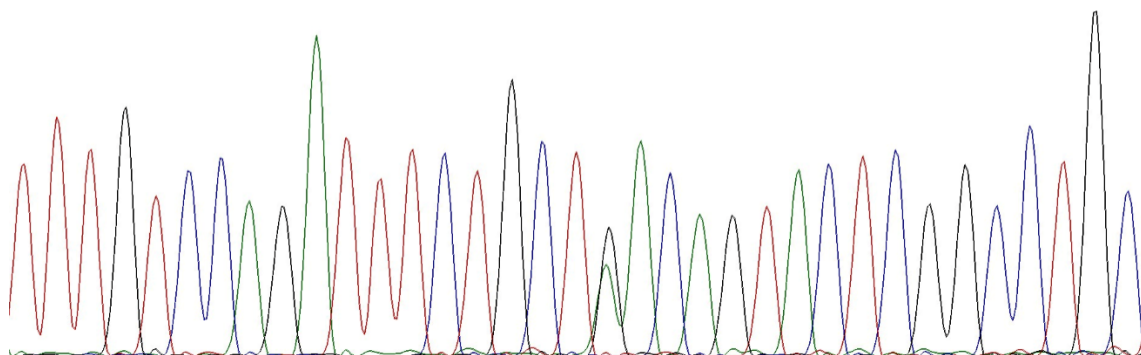
3.6. Potvrzení přítomností genetických variant

Přítomnost patogenní genetické varianty zjištěné pomocí NGS byla potvrzena Sangerovým sekvenováním, jednalo-li se o záměny jednoho nukleotidu/malé delece a inserce. Přítomnost CNV byla potvrzována pomocí metody MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification).

3.6.1. Sangerovo sekvenování

Samotnému Sangerovu sekvenování předcházela amplifikace cílové oblasti pomocí PCR. Primery na PCR byly navrženy na teplotu tání 60 °C pomocí webových nástrojů Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) a UCSC In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Primery byly dodány firmou GenetiBiotech. Pro PCR reakci byl použit kit PPP Master Mix (TopBio). Standardní amplifikační podmínky byly: 94°C/1 min; 40×(94°C/30 s; 60°C/30 s; 72°C/30 s); 72°C/7 min. Úspěšný průběh PCR a kvalita amplifikace byly zhodnoceny pomocí agarózové gelové elektroforézy.

T T T G T C C A G A T T T C T G C T A A C A G T A C T C G G C C T G C
G



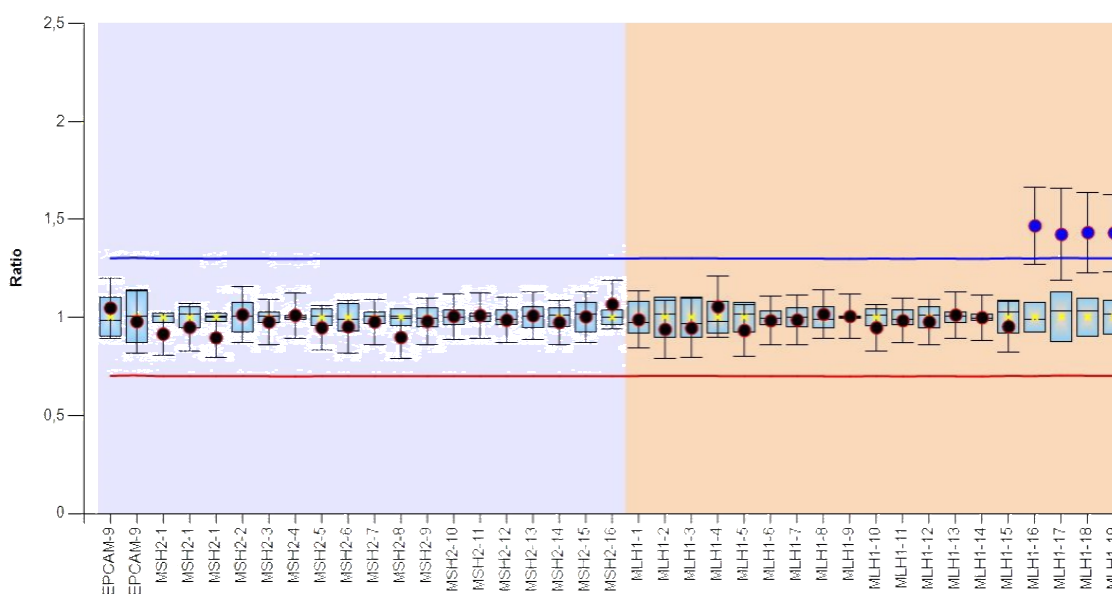
Obrázek 13. Příklad DNA sekvence *BRCA2* genu získané Sangerovým sekvenováním. Překryv fluorescenčního signálu značí heterozygotní genetickou variantu. V tomto případě záměnu adeninu za guanin.

Před provedením Sangerovy reakce s fluorescenčně značenými ddNTP, byl vzorek PCR očištěn od nespotřebovaných PCR primerů a dNTP pomocí ExoSAP-IT (Applied Biosystems). ExoSAP-IT obsahuje exonukléazu, štěpící jednořetězcovou DNA, a alkalickou fosfatázu, štěpící fosfátovou vazbu přítomnou v dNTP. Samotná Sangerova reakce byla provedena pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) a sekvenačního primeru. Výsledný produkt byl přečištěn srážecí reakcí za použití acetátu

sodného a ethanolu. Suchý produkt byl resuspendován ve formamidu, denaturován a analyzován na automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Sekvenační data byla vizualizována pomocí programu FinchTV 1.3.1 (Geospiza, Inc., obrázek 13).

3.6.2. MLPA

Detekce CNV probíhala pomocí metody MLPA (MRC Holland). Princip této metody je založen na ligaci dvou sond, které hybridizačně nasedají v cílové oblasti vedle sebe. Každá ze sond je opatřena komplementární sekvencí k cílové oblasti a k univerzálním fluorescenčně značeným primerům. V případě nasednutí obou sond a úspěšné ligace je možné amplifikovat spojenou sekvenci pomocí PCR. Na každý exon vyšetřovaného genu připadají sondy, které mají po ligaci odlišnou délku. To umožňuje jejich identifikaci kapilární elektroforézou (ABI Prism 3130, Applied Biosystems). Relativní síla signálu byla porovnávána proti kontrolnímu vzorku pomocí programu Coffalyser (MRC Holland). Snížení či zvýšení relativního signálu sondy umožňuje identifikaci delece/duplikace analyzované oblasti (obrázek 14).



Obrázek 14. Příklad vyhodnocení MLPA analýzy genů *EPCAM*, *MSH2* a *MLH1*. Výška signálu fluorescenčních sond pro jednotlivé exony je porovnávána s kontrolami a získaný poměr vyneseno do grafu. Vpravo je možné pozorovat duplikaci exonů 16-19 genu *MLH1*.

4. Výsledky

4.1. Vyšetření pacientů s karcinomem pankreatu

4.1.1. Patogenní varianty v predispozičních genech

Celkem byla vyšetřena genetická predispozice u 226 pacientů s PDAC. Patogenní varianty (PV) byly nalezeny v pěti genech (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*) z celkem 11 hlavních PDAC predispozičních genů (tabulka 8). Frekvence nosičů mutací byla čtyřikrát vyšší u pacientů (18/226; 8,0 %) než v kontrolním souboru (14/777; 1,8 %; $p = 2,7 \times 10^{-5}$). Polovina všech PV v hlavních predispozičních genech byla nalezena v genu *BRCA2* (N = 9). Dále byly PV nalezeny v genech *ATM* (N = 3) a *BRCA1* (N = 3), následované *PALB2* (N = 2) a *TP53* (N = 1). Srovnáním frekvencí PV u pacientů a v kontrolním souboru jsme spočítali rizika vzniku PDAC pro jednotlivé geny. Statisticky signifikantně zvýšené riziko představují PV v genu *BRCA1* (OR = 10,4; $p = 0,04$) a v genu *BRCA2* (OR = 6,4; $p = 0,0009$).

Mezi ostatními kandidátními geny bylo identifikováno 18 PV u celkem 16/226 (7,1 %) nosičů. Frekvence nosičů PV v těchto genech byla téměř dvakrát vyšší než u kontrolního souboru (30/777; 3,9 %; $p = 0,02$). Nejvíce PV bylo nalezeno v genu *CHEK2* (5/18; 27,8 %), u něhož jako jediného samostatného genu ze skupiny kandidátních genů vyšlo signifikantně zvýšené riziko vzniku PDAC (OR = 17,5; $p = 0,003$). Přehled všech identifikovaných PV je uveden v tabulce 9.

U dvou pacientů jsme našli více PV zároveň. Jeden pacient byl nosičem PV v genech *BRCA2* a *ERCC4*, druhý nosičem PV v genech *CHEK2*, *ERCC4* a *FANCG*. V kontrolním souboru nebyli žádní nosiči více PV.

Tabulka 8. Frekvence zárodečných PV v hlavních a kandidátních predispozičních genech u pacientů s PDAC v souboru nenádorových kontrol (PMC).

Skupina genů	Gen	PDAC pac.	PMC	OR (95% CI); p hodnota
		N = 226 (%)	N = 777 (%)	PDAC pac vs. PMC
PDAC geny	<i>ATM</i>	3 (1,3)	3 (0,4)	3,5 (0,5-26,1); 0,13
	<i>BRCA1</i>	3 (1,3)	1 (0,1)	10,4 (0,8-546,9); 0,04
	<i>BRCA2*</i>	9 (4,0)	5 (0,6)	6,4 (1,9-24,5); 0,0009
	<i>CDKN2A</i>	0	0	N.A.
	<i>MLH1</i>	0	0	N.A.
	<i>MSH2</i>	0	3 (0,4)	N.A.
	<i>MSH6</i>	0	0	N.A.
	<i>PALB2</i>	2 (0,9)	2 (0,3)	3,5 (0,2-47,9); 0,22
	<i>PMS2</i>	0	0	N.A.
	<i>STK11</i>	0	0	N.A.
	<i>TP53</i>	1 (0,3)	0	N.A.
	PV v PDAC genech	18	14	4,7 (2,3-9,6); 2,7×10⁻⁵
	Nosiči PV v PDAC genech	18 (8,0)	14 (1,8)	
Kandidátní geny	<i>BLM</i>	0	3 (0,4)	N.A.
	<i>BRIP1</i>	2 (0,9)	0	N.A.
	<i>CHEK2*</i>	5 (2,2)	1 (0,1)	17,5 (2,0-150,7); 0,003
	<i>ERCC4*</i>	4 (1,8)	5 (0,6)	2,8 (0,5-13); 0,12
	<i>FANCA</i>	0	3 (0,4)	N.A.
	<i>FANCD2</i>	0	1 (0,1)	N.A.
	<i>FANCE</i>	1 (0,4)	0	N.A.
	<i>FANCG*</i>	1 (0,4)	0	N.A.
	<i>FANCI</i>	0	1 (0,1)	N.A.
	<i>FANCM</i>	0	4 (0,5)	N.A.
	<i>HOXB13</i>	1 (0,4)	0	N.A.
	<i>MRE11</i>	0	2 (0,3)	N.A.
	<i>NBN</i>	3 (1,3)	3 (0,4)	3,5 (0,5-26,1); 0,13
	<i>POLD1</i>	1 (0,4)	0	N.A.
	<i>RAD50</i>	0	1 (0,1)	N.A.
	<i>RAD54L</i>	0	2 (0,3)	N.A.
	<i>RECQL</i>	0	3 (0,4)	N.A.
<i>SLX4</i>	0	1 (0,1)	N.A.	
PV v kandidátních genech	18	30	2,2 (1,2-3,9); 0,02	
Nosiči PV v kandidátních genech*	16 (7,1)	30 (3,9)		
Všechny PV	36	23		
Všichni nosiči PV*	33* (14,6)	23 (3,0)		

*Nosiči více PV v genech *BRCA2/ERCC4* a *CHEK2/ERCC4/FANCG*.

Tabulka 9. Přehled všech PV identifikovaných u pacientů s PDAC

Gen	HGVS c. označení	HGVS p. označení	Počet pac.
<i>ATM</i>	c.6095G>A	p.(Arg2032Lys)	1
<i>ATM</i>	c.6096-9_6096-5del	.	1
<i>ATM</i>	c.7327C>T	p.(Arg2443Ter)	1
<i>BRCA1</i>	c.2263G>T	p.(Glu755Ter)	1
<i>BRCA1</i>	c.2411_2412del	p.(Gln804LeufsTer5)	1
<i>BRCA1</i>	c.3770_3771del	p.(Glu1257GlyfsTer9)	1
<i>BRCA2</i>	c.1813dup	p.(Ile605AsnfsTer11)	1
<i>BRCA2</i>	c.1989del	p.(Phe663LeufsTer5)	1
<i>BRCA2</i>	c.3545_3546del	p.(Phe1182Ter)	1
<i>BRCA2</i>	c.475G>A	p.(Val159Met)	1
<i>BRCA2</i>	c.5073dup	p.(Trp1692MetfsTer3)	1
<i>BRCA2</i>	c.7415dup	p.(Cys2473ValfsTer2)	1
<i>BRCA2</i>	c.7480C>T	p.(Arg2494Ter)	1
<i>BRCA2</i>	c.8167G>C	p.(Asp2723His)	1
<i>BRCA2</i>	c.8755-1G>A	.	1
<i>BRIP1</i>	c.1328_1334del	p.(Cys443SerfsTer5)	1
<i>BRIP1</i>	c.2684_2687del	p.(Ser895Ter)	1
<i>CHEK2</i>	c.846+4_846+7del	.	1
<i>CHEK2</i>	c.909-2028_1095+330del (delece exonů 9-10)	p.(Met304Leufs)	1
<i>CHEK2</i>	c.917G>C	p.(Gly306Ala)	1
<i>ERCC4</i>	c.2395C>T	p.(Arg799Trp)	4
<i>FANCG</i>	c.778-2A>C	.	1
<i>HOXB13</i>	c.251G>A	p.(Gly84Glu)	1
<i>NBN</i>	c.657_661del	p.(Lys219AsnfsTer16)	3
<i>PALB2</i>	c.509_510del	p.(Arg170IlefsTer14)	2
<i>POLD1</i>	c.3148del	p.(Arg1050AlafsTer74)	1
<i>TP53</i>	c.542G>A	p.(Arg181His)	1

4.1.2. Klinicko-patologické charakteristiky nosičů mutací

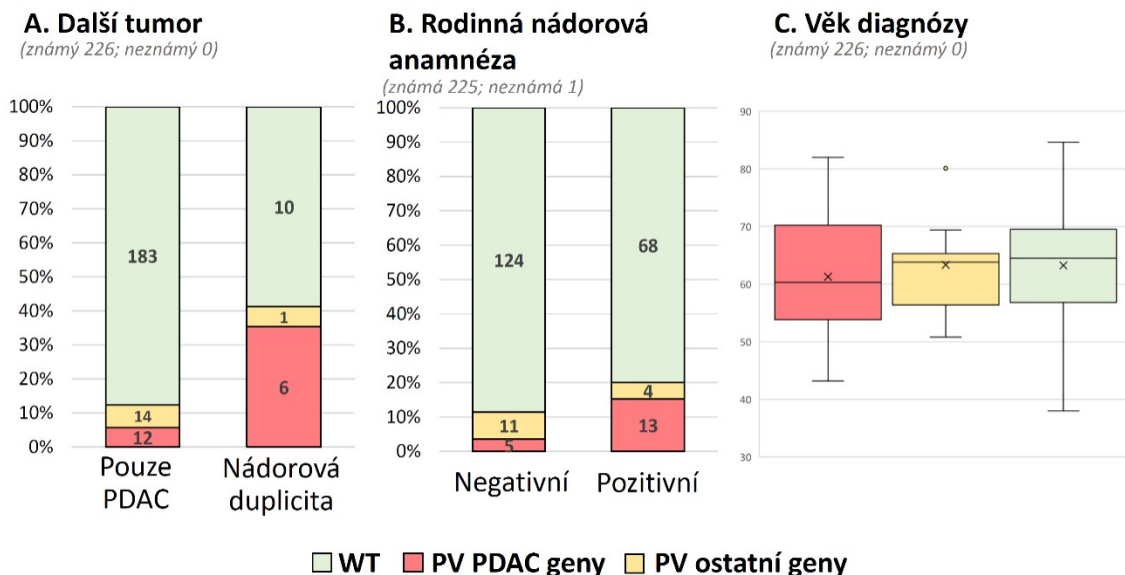
U pacientů byly hodnoceny klinicko-patologické charakteristiky onemocnění. Zatímco u pacientů pouze s PDAC byla zachycena frekvence nosičů PV v hlavních PDAC predispozičních genech 5,7 % (12/209), u pacientů s PDAC a dalším nádorovým onemocněním byla frekvence nosičů PV v těchto genech 6x vyšší (6/17; 35,3 %; $p = 0,001$; obrázek 15A).

U těchto šesti pacientů byly nalezeny PV v genech *BRCA2* (4×) a *BRCA1* (2×). U všech byl kromě PDAC diagnostikován buď karcinom prsu, nebo ovaria, v jednom případě oba. U jednoho pacienta s nádorovou duplicitou karcinomu prsu a PDAC byla nalezena PV

v genu *NBN*. Nicméně, všichni nosiči PV v hlavních PDAC predispozičních genech s dalšími nádorovými onemocněními měli rovněž pozitivní rodinnou nádorovou anamnézu.

Frekvence nosičů PV v hlavních predispozičních genech byla 4× vyšší u pacientů s pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou (13/85; 15,3 %) ve srovnání s frekvencí PV u pacientů bez nádorových onemocnění v rodině (5/140; 3,6 %; $p = 0,004$; obrázek 15B). U nosičů PV s pozitivní rodinnou anamnézou byly nalezeny PV v genech *BRCA2* (7×), *BRCA1* (3×), *ATM* (2×) a *TP53* (1×). Jeden z nosičů PV v *BRCA2* byl i nosičem další PV v genu *ERCC4*.

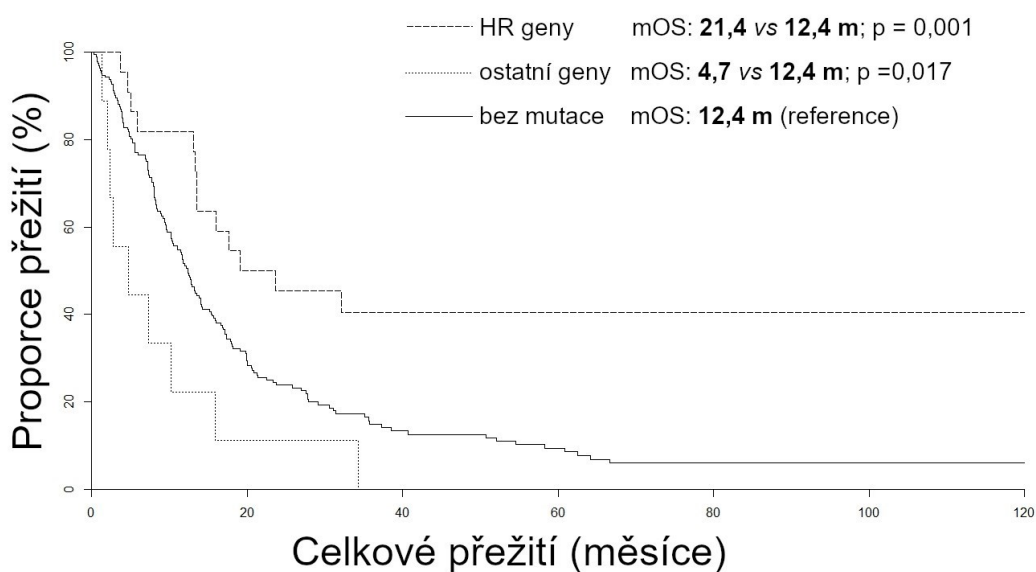
Mediány věku v době diagnózy nosičů PV v hlavních PDAC predispozičních genech (60,3 let) a nosičů PV v kandidátních predispozičních genech (63,8 let) se nelišily od mediánu věku diagnózy u pacientů bez mutace (64,5 let; obrázek 15C).



Obrázek 15. Zastoupení nosičů PV v rámci klinicko-patologických podskupin: A) Další tumor, B) Rodinná nádorová anamnéza, C) Věk v době diagnózy.

Pro 223/226 pacientů byly k dispozici údaje o délce jejich přežití od doby diagnózy. Informace o přežití byly dostupné pro 31/33 nosičů PV. Rozpětí doby přežití se pohybovalo mezi 0,3 až 281,1 měsíci. Střední hodnota přežití byla pro všechny pacienty 12,8 měsíce. Riziko úmrtí bylo signifikantně sníženo u pacientů s PV než u pacientů bez mutace. Střední hodnota přežití u pacientů bez mutace byla 12,4 měsíce, zatímco u nosičů mutací byla střední doba přežití 15,9 měsíce.

Skupinu mutovaných genů jsme dále rozdělili na geny účastníci se DNA reparační dráhy HR (*ATM*, *BRCA1/FANCS*, *BRCA2/FANCD1*, *BRIP1/FANCI*, *ERCC4/FANCD2*, *FANCD3*, *FANCG*, *PALB2/FANCD4*) a nosiče PV v ostatních genech (*HOXB13*, *CHEK2*, *NBN*, *POLD1*, *TP53*). Nosiči PV v genech HR měli významně lepší střední dobou přežití (mOS; 21,4 měsíce) než pacienti bez mutace (12,4 měsíce, $p = 0,001$) a nosiči PV v ostatních genech (4,7 měsíce, $p = 0,017$; obrázek 16).



HR geny	22	10	7	6	2	1	1
ostatní geny	9	1	0	0	0	0	0
WT	192	41	16	6	3	2	2

Obrázek 16. Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů s PV genech homologní rekombinace (HR), pacientů s PV v ostatních genech a pacientů bez mutace. mOS – střední doba přežití.

4.2. Vyšetření pacientek s karcinomem endometria

Celkem byla vyšetřena genetická predispozice u 527 pacientek s EC z deseti center. Záradečné PV byly častější mezi pacientkami s EC (118/527; 22,4 %) než u populačních kontrol (290/1662; 17,4 %; $p = 0,01$). Pacientky byly rozděleny na základě indikačních kritérií ke genetickému testování. Celkem 294 (47,2 %) pacientek by bylo indikováno ke genetickému vyšetření a zbylých 278 (52,8 %) pacientek by ke genetickému vyšetření indikováno nebylo. V rámci indikovaných pacientek splňovalo indikační kritéria pouze pro LS 151 (28,7 %) pacientek, pouze pro HBOC 16 (3,0 %) pacientek a obě indikační kritéria splnilo 82 (15,5 %) pacientek.

4.2.1. Patogenní varianty v 19 hlavních EC predispozičních genech

Patogenní varianty byly nalezeny ve 12 genech z celkových 19 genů spojených se známou predispozicí ke vzniku EC (tabulka 10). Frekvence mutací byla přibližně čtyřikrát vyšší u pacientek s EC (60/527; 11,4 %) než u populačních kontrol (46/1662; 2,8 %; $p = 9,7 \times 10^{-16}$).

Nosiček PV v genech LS bylo nalezeno 27/527 (5,1 %), zatímco v populačních kontrolách bylo těchto nosiček 4/1662 (0,25 %). Patogenní varianty v genech LS tak představují nejvyšší rizikový faktor ke vzniku EC (OR = 22,4; $p = 1,8 \times 10^{-17}$). Z genů LS byly nejvíce zastoupeny PV v *MSH6* (13/27; 48,1 %), následované PV v *MSH2* (8/27; 29,6 %) a v *MLH1* (6/27; 22,2 %). Patogenní varianty v *PMS2* nebyly nalezeny. Riziko vzniku EC pro jednotlivé geny LS bylo možné vypočíst pouze pro gen *MLH1* (OR = 19,1; $p = 1,3 \times 10^{-4}$).

Nosiček PV v genech spojených s HBOC bylo mezi pacientkami s EC nalezeno 35/527 (6,6 %), zatímco v populačních kontrolách bylo nosiček 42/1662 (2,5 %, $p = 7,9 \times 10^{-5}$). Nejčastěji mutovanými geny byly *BRCA1* (11/35; 31,4 %), *BRCA2* (7/35; 20,0 %) a *CHEK2* (6/35; 11,4 %). U všech tří genů bylo popsáno signifikantně zvýšené riziko vzniku EC, nicméně toto riziko bylo nižší než u nosiček PV v LS genech. *BRCA2* PV jsou spojeny s vysokým rizikem (OR = 7,4; $p = 0,002$), zatímco PV v *BRCA1* (OR = 3,9; $p = 0,001$) a *CHEK2* (OR = 3,2; $p = 0,004$) se středním rizikem (tabulka 10). Frekvence PV v ostatních HBOC genech se u pacientek nelišily od populačních kontrol. U dvou pacientek byly nalezeny PV zároveň ve dvou genech: *MLH1/BRCA1* a *MHS2/ATM*.

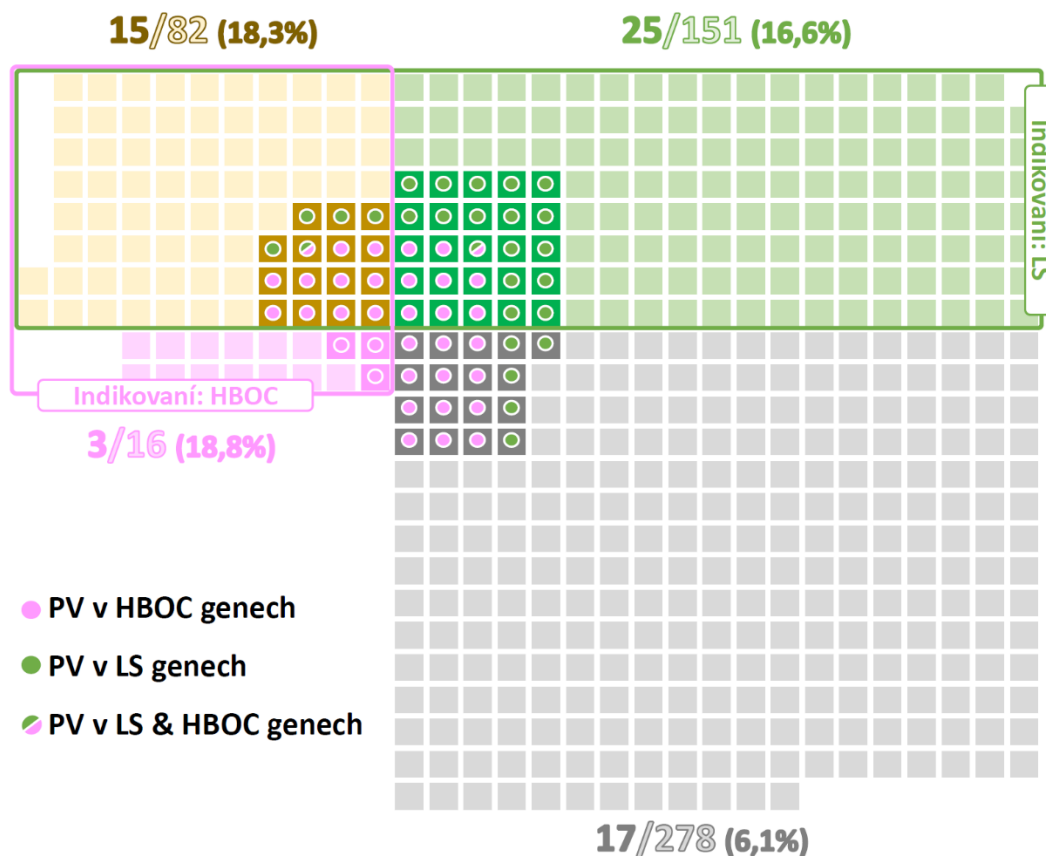
Zastoupení nosiček PV v rámci skupin indikovaných ke genetickému vyšetření bylo podobné: LS – 16,6 %; HBOC – 18,8 %; LS+HBOC – 18,3 %. Frekvence nosiček PV v těchto skupinách byla přibližně třikrát vyšší než ve skupině pacientek, které nesplňovaly žádná indikační kritéria (6,1 %; tabulka 10). Nejvyšší zastoupení nosiček PV v genech LS bylo ve skupině pacientek splňujících pouze indikační kritéria pro tento syndrom (17/151; 11,3 %). Obdobně bylo nejvyšší zastoupení nosiček PV v genech HBOC ve skupině pacientek splňujících pouze kritéria pro HBOC (3/16; 18,8 %). Skupiny pacientek indikovaných pro oba syndromy a neindikovaných pacientek měly sice odlišnou frekvenci nosiček PV (18,3 % vs. 6,1 %), poměr nosiček PV v LS:HBOC genech byl ale podobný (5:11 vs. 5:12, tabulka 10, obrázek 17). Ve skupině pacientek splňujících obě indikační kritéria nicméně převažovaly PV v genech s vysokou penetrancí (*MLH1*, *MSH2*, *BRCA1*),

kdežto se skupině neindikovaných pacientek byly častější PV v genech s nižší penetrancí (*MSH6*, *ATM*).

Tabulka 10. Frekvence zárodečných PV v 19 hlavních EC predispozičních genech u pacientek s EC. Zastoupení mutací je uvedeno pro jednotlivé skupiny dle indikačních kritérií (LS, HBOC, LS+HBOC, neindikované), všechny pacientky s EC a pro populační kontroly (PMC).

Skupina genů	Gen	Skupiny dle indikačních kritérií				Všechny EC pacientky N=527 (%)	PMC N=1662 (%)	OR (95% CI); p hodnota
		LS N=151 (%)	HBOC N=16 (%)	LS+HBOC N=82 (%)	Neindikované N=278 (%)			
Lynchův syndrom (LS)	<i>MLH1</i> *	3 (2,0)	0	2* (2,4)	1 (0,4)	6* (1,1)	1 (0,06)	19,1 (2,3-159,1); 1,3×10 ⁻⁴
	<i>MSH2</i> *	6* (4,0)	0	2 (2,4)	0	8* (1,5)	0	N.A.
	<i>MSH6</i>	8 (5,3)	0	1 (1,2)	4 (1,4)	13 (2,4)	0	N.A.
	<i>PMS2</i>	0	0	0	0	0	3 (0,18)	N.A.
	<i>EPCAM</i>	0	0	0	0	0	0	N.A.
	Všechny LS		17 (11,3)	0	5 (6,1)	5 (1,8)	27 (5,1)	4 (0,24)
HBOC	<i>ATM</i> *	1* (0,7)	0	1 (1,2)	3 (1,1)	5* (1,0)	7 (0,42)	2,3 (0,2-7,2); 0,2
	<i>BARD1</i>	0	0	1 (1,2)	0	1 (0,2)	0	N.A.
	<i>BRCA1</i> *	2 (1,3)	2 (12,5)	6* (7,3)	1 (0,4)	11* (2,1)	9 (0,54)	3,9 (1,6-9,5); 0,001
	<i>BRCA2</i>	1 (0,7)	1 (6,3)	0	5 (1,8)	7 (1,3)	3 (0,18)	7,4 (1,9-28,9); 0,002
	<i>BRIPI</i>	0	0	0	1 (0,4)	1 (0,2)	3 (0,18)	1,1 (0,1-10,1); 1,0
	<i>CDH1</i>	0	0	0	0	0	0	N.A.
	<i>CHEK2</i>	3 (2,0)	0	1 (1,2)	2 (0,7)	6 (1,1)	6 (0,36)	3,2 (1,0-9,9); 0,04
	<i>NF1</i>	0	0	0	0	0	1 (0,06)	N.A.
	<i>PALB2</i>	1 (0,7)	0	0	0	1 (0,2)	8 (0,48)	0,4 (0,1-3,1); 0,4
	<i>PTEN</i>	1 (0,7)	0	0	0	1 (0,2)	1 (0,06)	3,2 (0,2-50,5); 0,4
	<i>RAD51C</i>	0	0	2 (2,4)	0	2 (0,4)	2 (0,12)	3,2 (0,4-22,5); 0,2
	<i>RAD51D</i>	0	0	0	0	0	0	N.A.
	<i>STK11</i>	0	0	0	0	0	0	N.A.
	<i>TP53</i>	0	0	0	0	0	2 (0,12)	N.A.
Všechny HBOC		9 (6,0)	3 (18,8)	11 (13,4)	12 (4,3)	35 (6,6)	42 (2,53)	2,7 (1,7-4,3); 7,9×10 ⁻⁵
Všechny PV		26	3	16	17	62	46	
Všechny nosičky		25* (16,6)	3 (18,8)	15* (18,3)	17 (6,1)	60* (11,4)	46 (2,78)	

* Nosičky dvou PV v genech *MLH1/BRCA1* a *MSH2/ATM*.



Obrázek 17. Rozložení nosičů PV v rámci skupin pacientek splňujících/nespĺňujících indikační kritéria pro genetické testování LS/HBOC. Zelené čtverce označují pacientky splňující LS indikační kritéria, růžové HBOC kritéria, žluté obě kritéria a šedé čtverce označují pacientky nespĺňující žádná kritéria. Kolečka symbolizují nosiče PV v genech LS syndromu (zelené), HBOC (růžové), či obou (zelené/růžové).

4.2.2. Mutace v 207 kandidátních predispozičních genech

V ostatních kandidátních genech byly u pacientek identifikovány PV ve 48 genech z celkových 207. Frekvence nosiček PV u EC pacientek 66/527 (12,5 %) byla vyšší než v kontrolním souboru (122/1662; 7,3 %, $p = 0,004$; tabulka 11). Osm pacientek s EC mělo PV v hlavních predispozičních genech spolu s PV v kandidátních genech. Při hodnocení asociace PV se vznikem EC byly vyřazeny všechny nosičky PV v hlavních predispozičních genech ze skupin pacientek i kontrol. Frekvence nosiček PV v kandidátních genech byla i po vyřazení těchto nosiček signifikantně vyšší u 467 pacientek (58/467; 12,4 %) než u 1616 kontrol (122/1616; 7,5 %; $p = 1,2 \times 10^{-5}$). Nejčastěji mutovanými geny byly *MUTYH* (heterozygotní PV; 5/467; 1,1 %) a *FANCA* (4/467; 0,8 %). Frekvence PV v těchto genech se ale nelišila od populačních kontrol (*MUTYH* – 18/1616; 1,1 %; *FANCA* – 10/1616; 0,6 %). PV v žádném genu nebyly spojeny se signifikantně zvýšeným rizikem vzniku EC.

U tří pacientek byly nalezeny truncační varianty v genech kódujících DNA polymerázy ϵ (*POLE*, dvě varianty) a δ (*POLD1*, jedna varianta). Patogenní missense varianty v těchto genech byly již dříve spojeny s predispozicí k EC (Spurdle *et al.*, 2017). V kontrolním souboru byla nalezena pouze jedna truncační varianta v *POLE* a žádná v *POLD1*. Celková frekvence mutací v těchto dvou genech byla u pacientek (3/467; 0,6 %) významně vyšší než u kontrol (1/1616; 0,06 %) a tyto mutace jsou dohromady spojeny se signifikantně zvýšeným rizikem vzniku EC (OR = 10,44; p = 0,01).

Podíváme-li se na zastoupení nosiček PV v rámci skupin indikovaných ke genetickému vyšetření, frekvence nosiček PV ve skupině splňující LS+HBOC indikační kritéria (14/67; 20,9 %) byla významně vyšší než ve skupině neindikovaných pacientek (28/261; 10,7 %; p = 0,04, tabulka 11). Frekvence nosiček PV v indikačních skupinách pouze pro LS (14/216; 11,1 %) nebo HBOC (2/13; 15,4 %) se nelišily.

Tabulka 11. Frekvence zárodečných PV ve 207 kandidátních genech u pacientek s EC. Ze souboru byly vyřazeny nosičky PV v 19 hlavních predispozičních genech. Zastoupení mutací je uvedeno pro jednotlivé skupiny dle indikačních kritérií (LS, HBOC, LS+HBOC, neindikované), všechny pacientky s EC a pro populační kontroly (PMC).

Gen	Skupiny dle indikačních kritérií				EC pac.	PMC	OR (95% CI); p hodnota			
	LS N=126 (%)	HBOC N=13 (%)	LS+HBOC N=67 (%)	Neindik. N=261 (%)			1 (0,4)	N=467 (%)	N=1616 (%)	3 (0,2)
<i>ATRIP</i> *	0	0	1*	1	1	2*	(0,1)	0		1
<i>CASP8</i>	0	0	(1,5)	1 (0,4)	(0,4)	(0,4)	1	2 (0,1)	7 (0,4)	2
<i>DMBT1</i> *	0	1*	(1,5)	0		(0,2)		(0,1)	0	
<i>EMSY</i>	0	(7,7)	0 1*	1		3*		0		
<i>EPHX1</i>	1 (0,8)	0	(1,5)	0 (0,4)		(0,6)	1	2 (0,1)	3 (0,2)	10
<i>ERCC3</i> *	0	0	0	1		(0,2)	1	(0,6)	0	
<i>ERCC4</i> *	0	0	1*	(0,4)		(0,2)		1 (0,1)	1 (0,1)	7
<i>ERCC5</i>	0	0	(1,5)	0		2*		(0,4)	0	
<i>ERCC6</i> *	0	0	1*	1*		(0,4)		3 (0,2)	1 (0,1)	4
<i>EXO1</i>	2 (1,6)	0	(1,5)	0 (0,4)	0	1*		(0,2)		
<i>FAN1</i>	1 (0,8)	0	1	1 (0,4)		(0,2)	1	0		
<i>FANCA</i>	2 (1,6)	0	(1,5)	2*		(0,2)				
<i>FANCD2</i>	1 (0,8)	0	1	(0,8)	0	3*				
<i>FANCE</i>	1 (0,8)	0	(1,5)	1		(0,6)	3			
<i>FANCG</i>	0	0	0	(0,4)		(0,6)	2			
<i>FANCI</i>	1 (0,8)	0	0	2		(0,4)	4			
<i>FANCL</i> *	0	0	0	(0,8)		(0,9)	1			
<i>FANCM</i>	1	0	0	0		(0,2)	1			
(0,8) <i>KCNJ5</i>	0	0	0	0		(0,2)	1			
	0	0	0	1		(0,2)	1			
<i>LIG3</i>	0	0	1*	(0,4)		(0,2)				
<i>LRIG1</i>	0		(1,5)	0		1*				
			0	0		(0,2)	2			
			1	1		(0,4)	1			
			(1,5)	(0,4)		(0,2)	2			
			0	1		(0,4)				
				(0,4)		1 (0,2)				

Všechny EC pac vs. PMC	1, 6 (0, 1- 17 ,4) ; 0, 7	N. A. N.A. 4,8 (0,8 - 28, 5); 0,1	2, 3 (0, 4- 13 ,9) ; 0, 3	1, 3 (0, 4- 4); 0, 7 N. A.	3,2 (0, 2- 50, 5); 0,4 3,2 (0, 2-	50,5); 0,4 0,5 (0,1-3,7); 0,7 N.A. 2,3 (0,4-13,9); 0,3 3,2 (0,2- 50,5); 0,4 1,6 (0,3-8,6); 0,6 N.A.
---------------------------	---	---	---	--	---	--

<i>MCPHI</i>	0	0	0	2 (0,8)	2 (0,4)	7	1 (0,2-4,7);
<i>MENI</i>	1	0	0	0	1 (0,2)	(0,4)	1 N.A.
<i>MLH3</i>	(0,8)	0	0	1 (0,4)	1 (0,2)	0	3,2 (0,2-50,5);
<i>MRE11A</i>	0	0	0	1 (0,4)	1 (0,2)	1	0,4 N.A.
<i>MUTYH*</i>	0	0	2*	3 (1,1)	5 (1,1)	(0,1)	0,9 (0,3-2,4); 0,8
<i>NBN*</i>	0	0	(3) 0	0	2*	0	1 (0,2-4,7); 1
<i>POLD1*</i>	2*	0	1*	(0,4) 0	1*	18 (1,1)	N.A.
<i>POLE</i>	(1,6) 0	0	(1,5) 1	(0,2) 1	(0,4) 2	7 (0,4)	6,3 (0,6-69,8);
<i>PRF1*</i>	0	0	(1,5)	(0,4) 0	1*	0	0,1 3,2 (0,2-
<i>RAD1</i>	0	0	1*	(0,2) 0	1 (0,2)	1	50,5); 0,4 N.A.
<i>RAD17*</i>	0	1*	(1,5) 1	0	2*	(0,1)	3,2 (0,4-22,5);
<i>RAD51B</i>	0	(7,7) 0	(1,5)	(0,4) 1	(0,4) 1	1	0,2 N.A.
<i>RAD54L*</i>	0	0	1*	(0,2) 0	1*	(0,1)	3,2 (0,2-50,5);
<i>RBBP8</i>	0	0	(1,5) 0	(0,2) 1	(0,4) 1	0	0,4 N.A.
<i>RCF4*</i>	0	0	1*	(0,2) 0	1*	2 (0,1)	1,6 (0,1-17,4);
<i>RECQL</i>	1*	1	(1,5) 0	(0,2) 0	1 (0,2)	0	0,7 3,2 (0,2-
<i>RECQL4</i>	(0,8) 0	(7,7)	0	0	1 (0,2)	1	50,5); 0,4 1,1
<i>RNF168</i>	0	0	0	0	1 (0,2)	(0,1)	(0,2-5,2); 1 3,2
<i>SBDS</i>	1	0	1	1 (0,4)	1 (0,2)	0	(0,2-50,5); 0,4
<i>SETX</i>	(0,8)	0	(1,5)	1 (0,4)	1 (0,2)	2 (0,1)	0,3 (0,1-1,3); 0,1
<i>SLX4</i>	0	0	0	1 (0,4)	1 (0,2)	1 (0,1)	3,2 (0,2-50,5);
<i>XRCC4</i>	0	0	0	1 (0,4)	2 (0,4)	8 (0,5)	0,4 3,2 (0,2-
Všechny	0	0	0	1 (0,4)	2 (0,4)	1 (0,1)	50,5); 0,4
PV	0	0	0	29	66	21 (1,3)	6,3 (0,6-69,8); 0,1
	15	3	1			1 (0,1)	
			(1,5)			1 (0,1)	
			19			1 (0,1)	
						122	
Všechny	14*	2*	14* (20,9)	28* (10,7)	58* (12,4)	122 (7,5)	
nosičky	(11,1)	(15,4)					

*Nosičky PV ve dvou kandidátních predispozičních genech: *NBN/RCF4*, *ERCC3/ERCC6*, *DMBT1/RAD17*, *ATRIP/PRF1*, *POLD1/FANCL*, *ERCC4/RAD54L*, *ERCC4/RAD54L*, *MUTYH/ERCC3*, *DMBT1/RAD17*

4.2.3. Klinicko-patologická charakteristika nosičů mutací

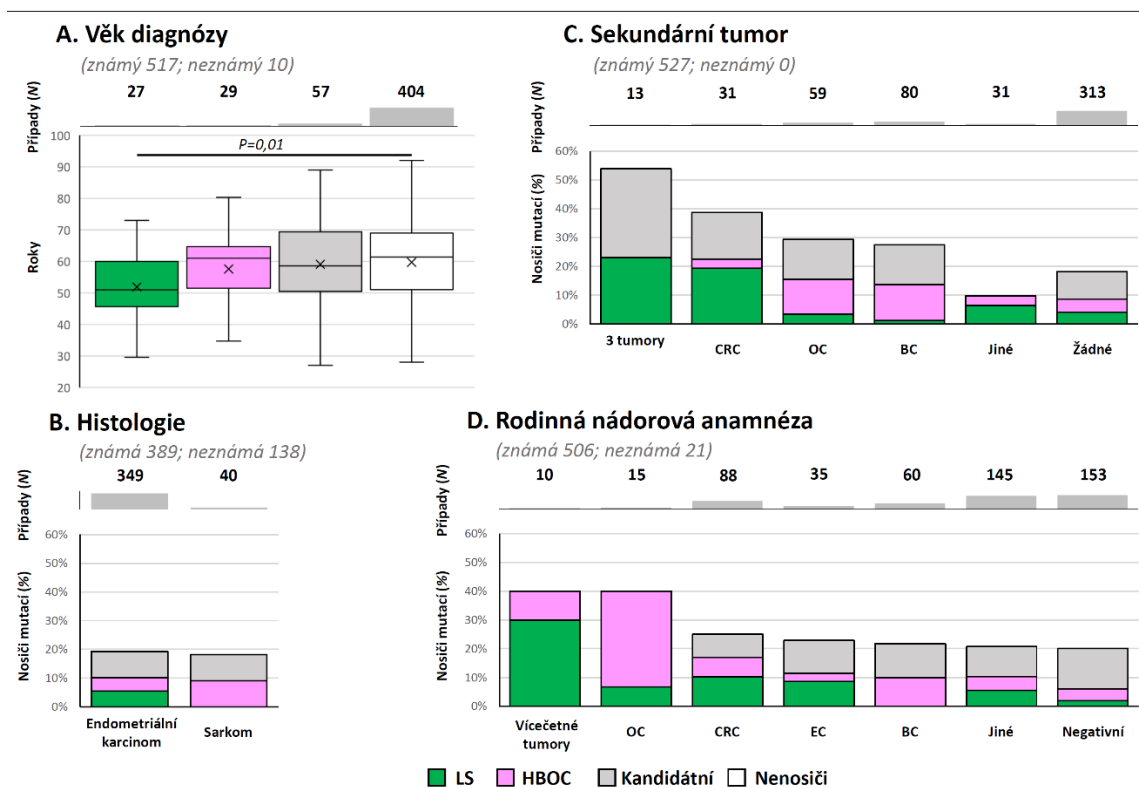
Medián věku diagnózy EC byl signifikantně nižší u nosiček PV v LS genech (51,0 let) v porovnání s pacientkami bez mutace (61,4 let; $p = 0,01$; obrázek 18A).

Rozdělení nosiček PV podle histologických typů nádorů neukázalo žádný statistický rozdíl (obrázek 18B). Celková frekvence nosiček PV byla podobná jak u pacientek s karcinomem endometria (39/349; 11,2 %), tak u pacientek se sarkomy (4/40; 10,0 %). Mezi pacientkami se sarkomem se nicméně nevyskytovaly nosičky PV v genech LS. Vzhledem k malému počtu pacientek se sarkomem ale tento rozdíl nebyl signifikantní. Dvě pacientky z osmi, které byly diagnostikovány s prekancerózou EIN, byly nosičkami PV v genu *BRCA1*.

Nejvyšší četnost PV v hlavních predispozičních genech byla u pacientek, které vyvinuly tři nezávislé tumory (3/13; 23,1 %), a u pacientek, které jako druhý tumor k EC

vyvinuly kolorektální karcinom (7/31; 22,6 %; obrázek 18C). Nosičky PV v genech LS byly více zastoupeny u pacientek s EC a kolorektálním karcinomem, stejně jako u pacientek s třemi tumory. Obdobně byly nosičky PV v HBOC genech více zastoupeny u pacientek, které k EC vyvinuly karcinom ovaria nebo prsu. Všech třináct pacientek s třemi tumory vyvinulo buď karcinom kolorekta (5/13; 38,4 %) a/nebo karcinom ovaria (10/13; 76,9 %).

Z hlediska rodinné nádorové anamnézy se ukázalo, že nejvyšší zastoupení nosiček PV v hlavních predispozičních genech (40 %) bylo u malé skupiny pacientek s vícečetným výskytem nádorů v rodině a u pacientek s rodinným výskytem karcinomu ovaria (obrázek 18D).



Obrázek 18. Relativní zastoupení nosičů mutací v rámci klinicko-patologických podskupin: (A) Věk v době diagnózy, (B) Histologie, (C) Sekundární tumor, (D) Rodinná nádorová anamnéza. BC = karcinom prsu, CRC = karcinom kolorekta, OC = karcinom ovaria.

U pacientek s rodinným výskytem vícečetných nádorů převažovaly nosičky PV v genech LS, zatímco u pacientek s rodinným výskytem karcinomu ovaria byla většina nosiček PV v HBOC genech.

Prevalence nosiček PV v kandidátních genech se neodlišovala od pacientek bez mutace v žádné z klinicko-patologických kategorií. Nosičky zárodečných PV v hlavních EC predispozičních genech a jejich klinicko-patologické informace jsou uvedeny v tabulce 12.

Informace o imunohistochemickém vyšetření MMR genů a o mikrosatelitové nestabilitě ve vzorcích nádorové tkáně EC byly nedostupné.

Tabulka 12. Seznam všech nosičů PV v hlavních EC predispozičních genech včetně klinické charakteristiky

Skupina genů	Gen	Varianta	Věk dg (roky)	Histologie	Splnila LS kritéria	Splnila HBOC kritéria
LS	<i>MLH1</i>	c.790+1G>A, p.(?)	58	Endometroidní	Ne	Ne
LS	<i>MLH1</i>	c.350C>T, p.(Thr117Met)	46	Endometroidní	Ano	Ano
LS	<i>MLH1</i>	Delece exonů 1-13	50	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MLH1</i>	c.677G>A, p.(Arg226Gln)	60	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MLH1</i>	c.1489dup, p.(Arg497ProfsTer6)	55	Endometroidní	Ano	Ne
LS,HBOC	<i>MLH1</i> <i>BRCA1</i>	c.1483dup, p.(His495ProfsTer29) c.5266dup, p.(Gln1756ProfsTer74)	48	Endometroidní	Ano	Ano
LS	<i>MSH2</i>	Delece exonů 5-6	54	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
LS	<i>MSH2</i>	c.1720del, p.(Gln574ArgfsTer16)	45	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
LS	<i>MSH2</i>	c.1500dup, p.(Arg501GlnfsTer12)	46	Endometroidní	Ano	Ano
LS	<i>MSH2</i>	c.2459-2_2472del, p.(Gly820fs)	51	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ano
LS	<i>MSH2</i>	Delece exonů 1-8	29	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MSH2</i>	Delece exonů 1-16	32	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MSH2</i>	Delece exonů 3	42	Endometroidní	Ano	Ne
LS,HBOC	<i>MSH2</i> <i>ATM</i>	c.1676del, p.(Leu559Ter) c.8147T>C, p.(Val2716Ala)	53	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.1754T>C, p.(Leu585Pro)	53	Endometroidní a serózní	Ne	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.964_967del, p.(Ala322ProfsTer15)	62	Endometroidní a světlobuněčný	Ne	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.2677_2678del, p.(Leu893AlafsTer6)	42	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.2348_2349del, p.(Cys783Ter)	45	Endometroidní a světlobuněčný	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.3261del, p.(Phe1088SerfsTer2)	62	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.1444C>T, p.(Arg482Ter)	65	Endometroidní	Ne	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.1754T>C, p.(Leu585Pro)	43	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.3995T>G, p.(Leu1332Ter)	60	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.885dup, p.(Val296SerfsTer16)	73	Endometroidní	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.2759del, p.(Lys920ArgfsTer25)	51	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.3261dup, p.(Phe1088LeufsTer5)	49	Endometroidní	Ano	Ano
LS	<i>MSH6</i>	c.741dup, p.(Arg248ThrfsTer8)	55	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
LS	<i>MSH6</i>	c.643del, p.(Val215Ter)	67	Endometroidní	Ne	Ne
HBOC	<i>ATM</i>	c.601C>T, p.(Gln201Ter)	78	Endometroidní	Ne	Ne
HBOC	<i>ATM</i>	c.2921+1G>A, p.(?)	55	Endometroidní	Ne	Ne
HBOC	<i>ATM</i>	c.3250C>T, p.(Gln1084Ter)	63	Papilární serózní	Ano	Ano

HBOC	<i>ATM</i>	Delece exonů 35-44	70	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ne	Ne
HBOC	<i>BARD1</i>	c.1690C>T, p.(Gln564Ter)	28	Endometroidní	Ano	Ano
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.1687C>T, p.(Gln563Ter)	80	EIN	Ne	Ne
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.2411_2412del, p.(Gln804LeufsTer5)	53	EIN	Ano	Ano
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.5266dup, p.(Gln1756ProfsTer74)	68	Leiomyosarkom	Ne	Ano
HBOC	<i>BRCA1</i>	Delece exonů 1-17	57	Endometroidní	Ne	Ano
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.5095C>T, p.(Arg1699Trp)	69	Endometroidní	Ano	Ano
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.5266dup, p.(Gln1756ProfsTer74)	61	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ano
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.5510G>A, p.(Trp1837Ter)	N.A.	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.68_69del, p.(Glu23ValfsTer17)	N.A.	Endometroidní	Ano	Ne
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.5266dup, p.(Gln1756ProfsTer74)	N.A.	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ano
HBOC	<i>BRCA1</i>	c.5266dup, p.(Gln1756ProfsTer74)	41	Papilární serózní	Ano	Ano
HBOC	<i>BRCA2</i>	c.6591_6592del, p.(Glu2198AsnfsTer4)	62	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ne	Ne
HBOC	<i>BRCA2</i>	c.5946del, p.(Ser1982ArgfsTer22)	55	Endometroidní	Ne	Ne
HBOC	<i>BRCA2</i>	c.7878G>C, p.(Trp2626Cys)	63	Leiomyosarkom	Ne	Ne
HBOC	<i>BRCA2</i>	c.6275_6276del, p.(Leu2092ProfsTer7)	57	Endometroidní	Ne	Ano
HBOC	<i>BRCA2</i>	c.5213_5216del, p.(Thr1738IlefsTer2)	50	Endometroidní	Ne	Ne
HBOC	<i>BRCA2</i>	c.2808_2811del, p.(Ala938ProfsTer21)	41	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
HBOC	<i>BRCA2</i>	c.658_659del, p.(Val220IlefsTer4)	N.A.	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ne	Ne
HBOC	<i>BRIP1</i>	c.2038_2039dup, p.(Leu680PhefsTer9)	71	Leiomyosarkom	Ne	Ne
HBOC	<i>CHEK2</i>	c.846+4_846+7del, p.(Asp265_His282del)	64	Endometroidní	Ne	Ne
HBOC	<i>CHEK2</i>	c.444+1G>A, p.(Gln149IlefsTer6)	62	Endometroidní	Ne	Ne
HBOC	<i>CHEK2</i>	c.444+1G>A, p.(Gln149IlefsTer6)	37	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ano
HBOC	<i>CHEK2</i>	c.894T>G, p.(Tyr298Ter)	61	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
HBOC	<i>CHEK2</i>	c.846+4_846+7del, p.(Asp265_His282del)	65	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
HBOC	<i>CHEK2</i>	c.846+4_846+7del, p.(Asp265_His282del)	44	Endometroidní	Ano	Ne
HBOC	<i>PALB2</i>	c.761C>G, p.(Ser254Ter)	53	Leiomyosarkom	Ano	Ne
HBOC	<i>PTEN</i>	c.170T>G, p.(Leu57Trp)	57	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ne
HBOC	<i>RAD51C</i>	c.502A>T, p.(Arg168Ter)	62	Endometroidní	Ano	Ano
HBOC	<i>RAD51C</i>	c.1026+4_1026+6del, p.(?)	34	Blíže neurčený maligní nádor těla děložního	Ano	Ano

5. Diskuze

5.1. Karcinom pankreatu

Ve výzkumu zaměřujícím se vyšetření genetické predispozice u PDAC jsme analyzovali 226 pacientů s tímto onemocněním. Celkově jsme identifikovali 14,6 % (33/226) nosičů zárodečných PV, z toho 18 nosičů PV v hlavních predispozičních genech (8,0 %). Podobné frekvence PV byly zjištěny ve studiích s neselektovanými pacienty z USA (7,7 %) a Kanady (10,7 %) (Brand *et al.*, 2018, Cremin *et al.*, 2020). V evropských pracích byly publikovány frekvence nosičů PV mezi 2-7 % (Lener *et al.*, 2016, Earl *et al.*, 2020, Fountzilias *et al.*, 2021).

Nejčastěji mutovanými hlavními predispozičními geny byly *BRCA2* (9×), *BRCA1* (3×) a *ATM* (3×). Varianty v těchto třech genech představovaly 83,3 % (15/18) všech PV v hlavních predispozičních genech. Zdaleka nejčastěji mutovaným genem byl *BRCA2*, jehož devět nosičů představovalo jednu polovinu všech nosičů PV v PDAC predispozičních genech a 4 % všech pacientů. *BRCA2* společně s *BRCA1* kóduje proteiny účastnící se DNA reparačních pochodů (HR) (Wright *et al.*, 2018) a jsou hlavními predispozičními geny u pacientů s HBOC syndromem (Schubert *et al.*, 2019). U nosičů mutací v obou genech jsme prokázali statisticky významné vysoce zvýšené riziko vzniku PDAC (*BRCA1*: OR = 10,4, p = 0,04; *BRCA2*: OR = 6,4, p = 0,0009). Na rozdíl od karcinomu prsu, u něhož je frekvence PV v *BRCA1* vyšší než v *BRCA2*, u PDAC je tomu naopak (Claes *et al.*, 2004, Pohlreich *et al.*, 2005). V naší práci jsme našli 1,3 % PV v genu *BRCA1* a 4,0 % PV v genu *BRCA2*. Podobná frekvence byla popsána i v dalších studiích, u pacientů s PDAC se PV v *BRCA2* objevují s 2-4× vyšší frekvencí než v *BRCA1* (Lowery *et al.*, 2018, Hu *et al.*, 2018, Dudley *et al.*, 2018). V kontrastu s tím stojí dvě studie z USA, které našly stejnou frekvenci PV v obou genech (Yurgelun *et al.*, 2019, Brand *et al.*, 2018). Riziko asociované s PV v *BRCA1* bylo v naší studii vyšší než pro *BRCA2*, nicméně široké rozmezí konfidenčního intervalu pro *BRCA1* riziko a vyšší prevalence PV v *BRCA2* napovídá, že skutečné riziko PDAC je pro *BRCA1* nižší než pro *BRCA2*. Tento závěr je podpořen zahraniční studií od Hu *et al.* (*BRCA1*: OR = 2,6 vs. *BRCA2*: OR = 6,2) (Hu *et al.*, 2018).

Všichni tři nosiči zárodečných mutací v *BRCA1* měli pozitivní rodinnou nádorovou anamnézu. Všichni měli rodinný výskyt karcinomu spojeným s HBOC syndromem

(karcinom prsu/ovaria) a dva měli i rodinný výskyt PDAC. Dva nosiči rovněž před PDAC vyvinuli karcinom ovaria, zatímco třetí vyvinul pouze PDAC.

Z devíti nosičů zárodečných mutací v *BRCA2* genu mělo pozitivní rodinnou nádorovou anamnézu 7 nosičů (77,8 %). V rodinách těchto nosičů byl výskyt karcinomu prsu (3×), PDAC (3×) a karcinomu kolorekta (2×). Čtyři nosiči (44,4 %) před diagnózou PDAC vyvinuli karcinom prsu.

Stejná frekvence PV jako *BRCA1* byla nalezena u genu *ATM* (3/226; 1,3 %). Bialelická inaktivace *ATM* způsobuje onemocnění ataxia telangiectasia (Rothblum-Oviatt *et al.*, 2016), zatímco heterozygotní zárodečné PV jsou spojeny se středním rizikem vzniku některých tumorů, včetně BC a PDAC (Armstrong *et al.*, 2019). Všichni nosiči PV v *ATM* měli pozitivní rodinnou nádorovou anamnézu. Dva nosiči měli rodinný výskyt kolorektálního karcinomu a jeden karcinomu močového měchýře. Ani jeden ze tří nosičů nevyvinul další tumor k PDAC. V naší studii nebylo dosaženo staticky významné asociace PV v *ATM* se vznikem PDAC. To může být dáno malou velikostí námi vyšetřovaného souboru pacientů. Nicméně, statisticky významně zvýšené riziko vzniku PDAC u nosičů PV v genu *ATM* bylo popsáno v rozsáhlých studiích z Kanady (OR = 7,7) a USA (OR = 5,7) (Hu *et al.*, 2018, Cremin *et al.*, 2020).

PALB2 je nádorovým predispozičním genem, jehož proteinový produkt se účastní DNA opravné dráhy HR. Zárodečné PV *PALB2* jsou spojeny zejména s predispozicí ke karcinomu prsu, ale také k PDAC a další asociace je možná s karcinomy ovaria nebo kolorekta (Yang *et al.*, 2020). Identifikovali jsme dva nosiče (2/226; 0,9 %) shodné zárodečné PV c.509_510del, p.(Arg170IlefsTer14). Oba nosiči měli negativní rodinnou nádorovou anamnézu a před PDAC nevyvinuli žádný další tumor. I když naše výsledky naznačují mírně zvýšené riziko vzniku PDAC pro nosiče zárodečných PV v *PALB2*, asociace s PDAC nedosáhla statisticky významné hladiny (OR = 3,5; p = 0,2). Podobně zvýšeného rizika se statisticky významnou asociací s PDAC dosáhla rozsáhlá zahraniční studie zaměřující se na vztah zárodečných PV v *PALB2* k různým nádorovým onemocněním (RR = 2,37, p = 0,009) (Yang *et al.*, 2020).

TP53 je tumor supresorový gen, jehož zárodečné mutace způsobují Liův-Fraumeniho syndrom, typický svým širokým spektrem nádorových onemocnění, mezi něž patří karcinom prsu, sarkomy kostí a tumory mozku (Kamihara *et al.*, 2014). Zárodečná PV v *TP53* byla nalezena u jednoho pacienta, který měl pozitivní rodinnou nádorovou anamnézu (výskyt

PDAC a karcinomu prsu) a vyvinul pouze PDAC. Asociaci PDAC s genem *TP53* zatím popsali pouze Ruijs *et al.* Dva pacienti v této práci, kteří vyvinuli PDAC, byli nosiči zárodečné PV v exonech 5 a 6 podobně jako námi identifikovaný nosič (exon 5) (Ruijs *et al.*, 2010). Podobně jako u PV v *PALB2*, nepozorovali jsme statisticky významnou asociaci se vznikem PDAC.

Mezi kandidátními geny, jejichž asociace se vznikem PDAC není známá, byl počet nosičů PV nejvyšší v genech *CHEK2* (5×), *ERCC4* (4×) a *NBN* (3×). Nosiči PV v genu *CHEK2* představovali 2,2 % všech PDAC pacientů (5/226). Jedná se o dokonce vyšší frekvenci PV než u genu *BRCA1*. *CHEK2* je asociován s predispozicí k různým nádorovým onemocněním, jako jsou karcinomy prsu, prostaty a pankreatu, a je spojen s nízkou až střední penetrancí (Cybulski *et al.*, 2004, Stolarova *et al.*, 2020a). Zvýšená frekvence PV v *CHEK2* u PDAC pacientů byla zmíněna v několika NGS studiích, v žádné ale nebylo dosaženo statisticky významné asociace (Fountzilias *et al.*, 2021, Hu *et al.*, 2018, Zhan *et al.*, 2018). V naší studii byl *CHEK2* jediným z kandidátních genů, u něhož jsme popsali statisticky významně zvýšené riziko vzniku PDAC u nosičů zárodečných PV variant.

ERCC4 byl druhým nejčastěji mutovaným kandidátním predispozičním genem. Zárodečná bialelická inaktivace *ERCC4* způsobuje onemocnění xeroderma pigmentosum komplementační skupiny F, Cockayneův syndrom nebo Fanconioho anemii (komplementační skupina Q) (Doi *et al.*, 2018). Naše analýza odhalila u všech nosičů PV v *ERCC4* stejnou variantu c.2395C>T, p.(Arg799Trp) (4/226; 1,3 %). Tato varianta ale byla přítomna i u populačních kontrol (5/777; 0,6 %). Mutace v *ERCC4* jsou spojeny s mírně zvýšeným rizikem vzniku PDAC (OR = 2,8, p = 0,12) bez statistické významnosti. Heterozygotní nosiči stejné PV v *ERCC4* byli popsáni mezi PDAC pacienty ve studii z USA, jejíž autoři doporučují zahrnout *ERCC4* do panelového testování zárodečných variant (Goldstein *et al.*, 2020).

Dalším příkladem časté genetické varianty v naší populaci je c.657_661del, p.(Lys219AsnfsTer16) v genu *NBN*. Bialelické mutace v *NBN* jsou příčinou Nijmegenského syndromu lomivosti (NBS – Nijmegen breakage syndrom) spojeným s mikrocefalií, imunodeficiencí a nádorovými onemocněními v dětském věku (Chrzanowska *et al.*, 2012). Heterozygotní mutace jsou spojeny zejména se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (Abe *et al.*, 2021). Asociace této varianty se vznikem PDAC byla již dříve popsána u polských (OR = 3,8; p = 0,002) a u českých pacientů (OR = 9,7; p = 0,006) (Lener *et al.*,

2016, Borecka *et al.*, 2016). Námi vypočtené riziko PDAC spojené s touto zárodečnou mutací v *NBN* bylo podobné výsledkům z polské práce (OR = 3,5), nicméně kvůli vysoké frekvenci této varianty v souboru PMC (3/777; 0,4 %) nebylo statisticky signifikantní. Z výsledků analýzy genu *NBN* a *ERCC4* tak vyplývá, že pro hodnocení rizik u nosičů PV spojených s různými nádorovými onemocněními je nezbytné využití populačně specifických kontrol, a to zejména u genů, u nichž se vyskytují „founder“ mutace v určitých populacích (Rump *et al.*, 2016).

Z našich výsledků vyplývá, že pozitivní rodinná nádorová anamnéza je významným rizikovým faktorem pro identifikaci nosičů zárodečných PV v hlavních PDAC predispozičních genech. Pacienti s PDAC, jejichž příbuzní (první a druhý stupeň) vyvinuli PDAC, karcinom prsu/ovaria/kolorekta nebo melanom, měli podstatně vyšší pravděpodobnost, že jsou nosiči zárodečné PV v hlavních PDAC predispozičních genech, ve srovnání s pacienty bez rodinné nádorové anamnézy (OR = 4,9; p = 0,004). Podobně Salo-Mullen *et al.* a Hu *et al.* pozorovali významnou roli rodinné nádorové anamnézy coby rizikového faktoru (Salo-Mullen *et al.*, 2015, Hu *et al.*, 2018). Shindo *et al.* nicméně upozorňují na nutnost zvážení i dalších faktorů kromě rodinné nádorové anamnézy, v čemž s nimi souhlasí další dvě americké studie (Shindo *et al.*, 2017, Lowery *et al.*, 2018, Dudley *et al.*, 2018).

Dále jsme zjistili, že přítomnost dalšího nádorového onemocnění (karcinom prsu/ovaria/kolorekta, melanom) u probanda spolu s PDAC je silným ukazatelem přítomnosti zárodečné PV v některém z hlavních PDAC predispozičních genů, jak ostatně bylo již dříve publikováno (Dudley *et al.*, 2018).

Z našich výsledků nebyl patrný žádný rozdíl ve věku diagnózy mezi nosiči PV v hlavních PDAC predispozičních genech a pacienty bez zárodečné PV. Podobné výsledky byly zjištěny v pracích z USA a Kanady (Grant *et al.*, 2015, Smith *et al.*, 2016). Nicméně, některé studie publikovaly rozdílný věk v době diagnózy pro nosiče zárodečných PV a pacienty bez PV. Salo-Mullen *et al.* uváděli tento rozdíl 58 vs. 64 let (Salo-Mullen *et al.*, 2015) a Yadav *et al.* pozorovali rozdíl 63 vs. 66 let (Yadav *et al.*, 2020). Souvislost přítomnosti zárodečné PV a věkem diagnózy PDAC je proto dosud nejasná. Současné CAPS směrnice nedoporučují screening vysoce rizikových jedinců před 50. rokem života, s výjimkou pacientů s Peutzovým-Jeghersovým syndromem a hereditární pankreatitidou (Goggins *et al.*, 2020).

NCCN (National Comprehensive Cancer Network) směrnice v současné verzi 2.2023 doporučují genetické testování všech pacientů s PDAC, stejně jako přímých příbuzných pacienta s PDAC (nccn.org). Česká doporučení Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP od loňského roku zahrnují genetické testování u všech pacientů s PDAC (<https://slg.cz/doporuceni/testovani-brca-lecba/>).

Analýza přežití PDAC pacientů potvrdila pozitivní dopad zárodečné PV na celkové přežití pacientů 15,9 vs. 12,4 měsíců, obrázek 16). Nejlepší přežití vykazovali nosiči zárodečné PV v genech účastnících se procesů HR (21,4 vs. 12,4 měsíců). Podobná data publikovali Golstein *et al.* (17,9 vs. 9,6 měsíců), Fountzilias *et al.* (22,6 vs. 13,9 měsíců) a Yurgelun *et al.* (34,4 vs. 19,1 měsíců) (Goldstein *et al.*, 2020, Fountzilias *et al.*, 2021, Yurgelun *et al.*, 2019). Zárodečné PV v genech neúčastnících se HR byly spojeny s horším přežitím (4,7 vs. 12,4 měsíců; OR = 3,26; p = 0,017). Nicméně, tyto výsledky pocházejí z velmi malého souboru devíti pacientů, u nichž byl tumor prognosticky nepříznivě lokalizován. Výsledky je tak nutno potvrdit na větším souboru pacientů.

Znalost zárodečných PV a s nimi spojené riziko vzniku PDAC má zásadní význam jak pro pacienty s PDAC, tak pro jejich příbuzné. Na základě přítomnosti zárodečných variant lze rozhodnout o nasazení specifických terapeutik, jako jsou například inhibitory PD-1 dráhy (programmed death receptor-1) u pacientů s mutacemi v MMR genech nebo inhibitory PARP (poly(ADP-riboza)polymerázy) pro pacienty s mutacemi v HR genech (Golan *et al.*, 2019, Le *et al.*, 2017).

Rodinná nádorová anamnéza spoléhala na nahlášení údajů pacientem, což může potenciálně vést k nepřesnostem v lékařském záznamu. Pro přesné určení rizik a formulování doporučení ohledně nosičů PV je nutné provést další a větší studie s detailními informacemi o osobní i rodinné nádorové anamnéze.

5.2. Karcinom endometria

Ve výzkumu zaměřujícím se na vyšetření genetické predispozice u EC jsme analyzovali 527 pacientek s tímto onemocněním. Celkově jsme identifikovali 118 (22,4 %) zárodečných PV, z toho 60 nosiček PV v hlavních EC predispozičních genech (11,4 %).

Dědičné genetické riziko vzniku EC je v současné době spojeno výhradně se zárodečnými PV v genech spojených s LS. V této práci představovaly nosičky PV v LS genech 5,1 % všech vyšetřených EC pacientek. Obrázek 19 ukazuje srovnání frekvencí PV

v predispozičních genech popsaných v této a dalších dosud publikovaných pracích. Popsané frekvence nosičů PV v LS genech se pohybují ve velmi širokém rozpětí 1,1-22,7 %. Proměnlivá frekvence nosičů PV v rámci těchto studií je způsobena různými kritérii pro výběr pacientek. Zatímco studie uvádějící nejvyšší frekvence nosičů PV v LS genech zahrnovaly EC pacientky s vysokým rizikem, u nichž byla LS pozitivní rodinná anamnéza nebo imunohistochemické vyšetření MMR genů, studie uvádějící nižší frekvence nosičů vyšetřovaly pacientky z neselektované populace. Frekvence našich nosičů PV v LS genech se nachází ve středu spektra. Naše výsledky odpovídají rozdílnému přístupu ve výběru pacientek. Ve skupině pacientek, které splňovaly indikační kritéria pro genetické testování pacientek s LS, bylo zastoupení nosiček PV v LS genech 22/233 (9,4 %), ve srovnání s 5/294 (1,7 %) nosiček ve skupině pacientek nesplňujících LS indikační kritéria (obrázek 17). Tyto hodnoty tak odpovídají publikovaným výsledkům u vysoce rizikových pacientek (Karpel *et al.*) a neselektovaných pacientek (Huang *et al.*). Rizika vzniku EC pro nosiče PV v predispozičních genech jsou vyčíslena pouze v jedné publikaci (LaDuca *et al.*, 2020). Ačkoliv se frekvence nosičů v této publikaci lišily od našich výsledků, celkové riziko EC pro nosiče PV v LS genech bylo podobné (Král *et al.*: OR = 22,4; LaDuca *et al.*: OR = 20,1).

Třebaže méně než pětina vyšetřených EC pacientek splňovala HBOC indikační kritéria pro genetické vyšetření (98/527; 18,6 %), celková frekvence nosiček PV v genech *BRCA1/BRCA2* byla výrazně vyšší než u ostatních studií (3,42 % vs. 0-2,2 %) (obrázek 19). Z 16 pacientek, které splňovaly pouze indikační kritéria pro HBOC syndrom, a ne pro LS, byly tři nosičky zárodečných PV v *BRCA1* a *BRCA2* (3/16; 18,8 %). Ve skupině pacientek, které splňovaly obě indikační kritéria, byla celková frekvence PV v *BRCA1* stejná jako všechny PV v LS genech (5/82; 6,1 %). PV v genu *BRCA2* se v této skupině nenacházely. Nicméně, riziko vzniku EC bylo pro nosičky PV v *BRCA1/2* genech nižší než pro nosičky PV v LS genech. Toto riziko bylo pro *BRCA1* podobné tomu, které uvádějí LaDuca *et al.* (Král *et al.*: OR = 3,9 vs. LaDuca *et al.*: OR = 3,1), ovšem pro nosičky zárodečných PV v *BRCA2* bylo vyšší, než uvádějí LaDuca *et al.* (Král *et al.*: OR = 7,4 vs. LaDuca *et al.*: OR = 2,4). Naše výsledky naznačují, že zárodečné PV v genech *BRCA1* jsou spojeny se středním rizikem EC, zatímco PV v genu *BRCA2* jsou spojeny s vysokým rizikem. EC by tak mohl představovat další projev HBOC syndromu a měl by být zařazen do indikačních kritérií ke genetickému testování u těchto pacientů. Toto stanovisko je podpořeno malou studií provedenou Vietri *et al.*, která identifikovala nosičky PV v *BRCA1/BRCA2* u 9/21 pacientek

s dědičnou formou EC. Tyto pacientky navíc splňovaly HBOC indikační kritéria (Vietri *et al.*, 2021).

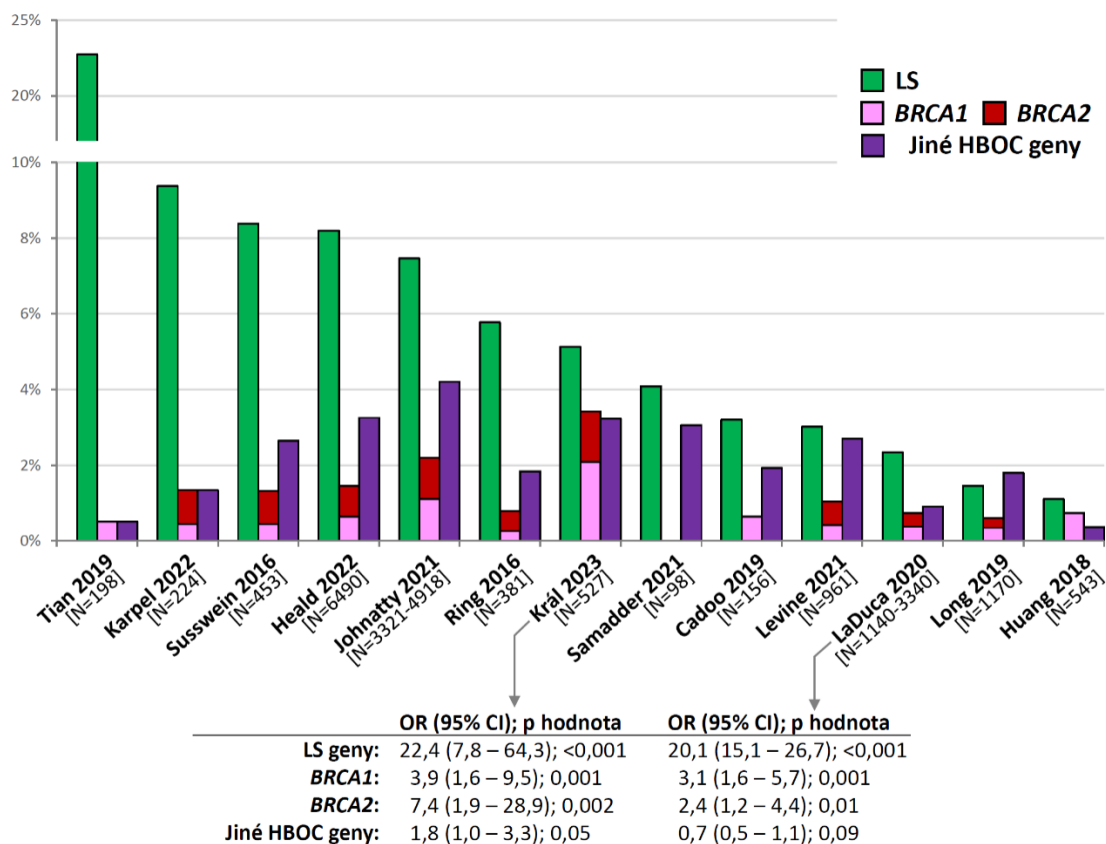
Mezi dalšími HBOC geny byl nejčastější výskyt PV v genech *CHEK2* (6/527; 1,1 %) a *ATM* (5/527; 1,0 %). U genu *CHEK2* bylo prokázáno statisticky významně zvýšené riziko vzniku EC u nosiček PV (OR = 3,2, p = 0,04). Mutace v genu *CHEK2* byly již dříve spojeny s predispozicí k EC v naší populaci (Stolarova *et al.*, 2020b). Asociaci mutací genu *CHEK2* udává i práce z USA (Karpel *et al.*, 2022).

Pouze dvě zahraniční práce publikovaly nález zárodečných mutací v *ATM* (Cadoo *et al.*, 2019, Johnatty *et al.*, 2021). Johnatty *et al.* pozorovali stejnou prevalenci nosičů PV v *ATM* (1,0 %), zatímco Cadoo *et al.* zaznamenali téměř dvojnásobnou prevalenci (1,9 %). Rizika vzniku EC spojená s mutacemi v *ATM* nejsou známa.

Žádný z jednotlivých kandidátních genů neprokázal staticky významnou asociaci se vznikem EC. Pouze u genů kódujících DNA polymerázy *POLD1* a *POLE* byla pozorována společná asociace s EC. V těchto genech jsme identifikovali tři zárodečné varianty vedoucí ke vzniku zkráceného proteinového produktu (*POLD1* 1×, *POLE* 2×). Riziko vzniku EC u nosičů těchto variant je významně zvýšené (OR = 10,44; p = 0,01). Zárodečné missense mutace postihující exonukleázové domény v obou těchto genech byly již dříve asociovány s predispozicí k EC (Spurdle *et al.*, 2017), přičemž somatické mutace v *POLE* představují významný prognostický marker EC (Yen *et al.*, 2020, Leon-Castillo *et al.*, 2020, Green *et al.*, 2020). Pro přesné určení role zárodečných trunkačních variant v *POLD1* a *POLE* je nicméně nutné provést analýzu podstatně větší kohorty pacientek, a to zejména kvůli vzácnému výskytu nosiček mutací v těchto genech.

Analýza klinicko-patologických charakteristik potvrdila dříve publikovaná data, že věk diagnózy je u nosiček PV v LS genech nižší ve srovnání s pacientkami bez PV (Ring *et al.*, 2016, Long *et al.*, 2019, Tian *et al.*, 2019, Levine *et al.*, 2021). Nicméně i v samotné skupině LS genů se průměrný věk diagnózy lišil. Zatímco u nosiček PV v genech *MLH1/MSH2* byl průměrných věk diagnózy 48 let, pro nosičky PV v *MSH6* se jednalo o 56 let. Tento výsledek je v souladu s již dříve publikovanými údaji (Ryan *et al.*, 2017, Tian *et al.*, 2019). Pro pacientky s PV v HBOC genech se věk diagnózy nelišil od pacientek bez PV, což také odpovídá dříve publikovaným výsledkům (Levine *et al.*, 2021).

Ostatní rozdíly v klinicko-patologických charakteristikách nosiček PV odpovídají tomu, do jaké podskupiny byly pacientky zařazeny na základě indikačních kritérií pro zárodečné genetické testování. Nejvyšší frekvence nosiček PV v LS genech byla u pacientek, s ≥ 3 tumory, u pacientek s karcinomem kolorekta jako sekundárním tumorem a u pacientek s rodinnou anamnézou obsahující vícečetné nádory nebo karcinom kolorekta. Obdobně byla nejvyšší frekvence nosiček PV v HBOC genech mezi těmi pacientkami, které vyvinuly tumor spojený s HBOC syndromem (karcinom prsu/ovaria) a které měly rodinný výskyt HBOC tumorů. Nosičky PV v kandidátních genech se nijak nelišily od pacientek bez PV.



Obrázek 19. Srovnání mezi publikovanými výsledky popisujícími zárodečné PV u EC pacientů. Zelené sloupce reprezentují nosiče PV v genech LS, růžové a červené sloupce nosiče PV v *BRCA1* a *BRCA2* a fialové sloupce reprezentují nosiče PV v ostatních HBOC genech.

Celková frekvence nosiček PV byla mezi EC pacientkami s dvěma tumory 15,4 % (33/214). Ve skupině 69 pacientek, které vyvinuly EC i karcinom ovaria, bylo osm nosiček PV v HBOC genech (11,6 %) a čtyři nosičky PV v LS genech (5,8 %; zahrnuta i nosička

souběžné mutace v *BRCA1* a *MLH1*, u níž byly diagnostikovány EC, karcinom ovaria a karcinom prsu). Ve skupině 34 pacientek s EC a karcinomem kolorekta bylo identifikováno osm nosiček PV v LS genech (23,5 %) a pouze jediná nosička PV v HBOC genu (*CHEK2*; 2,9 %). Tyto výsledky naznačují, že samotná přítomnost dvou primárních tumorů by mohla představovat hlavní indikační kritérium pro zárodečné genetické testování, jak ostatně potvrzují předchozí publikace (Bychkovsky *et al.*, 2022, Lhotova *et al.*, 2020, Wieme *et al.*, 2021, Stolarova *et al.*, 2020a).

Dle očekávání byla naprostá většina nosiček PV identifikována mezi pacientkami splňujícími některá z indikačních kritérií ke genetickému testování, přičemž nalezené PV korespondovaly s indikovaným syndromem. Celkově 43/60 (71,7 %) nosiček PV bylo indikováno ke genetickému vyšetření. Nicméně, 17 nosiček PV by za současných podmínek nebylo indikováno k žádnému genetickému vyšetření. Tyto nosičky představují více než jednu čtvrtinu (28,3 %) všech identifikovaných nosiček PV. Objevily se mezi nimi PV jak v LS genech (*MLH1*, *MSH6*), tak v HBOC genech (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*). Z těchto 17 nosiček dvě vyvinuly sekundární tumor a sedm mělo výskyt nádorového onemocnění v rodině, ovšem v kombinacích, které nespĺňují současná indikační kritéria ke genetickému testování.

Přednostmi této studie jsou homogenita studované populace, složené ze slovanské české populace, a použití populačně specifických kontrol, které umožnily vyčíslení rizik vzniku EC. Limitace této studie spočívají v tom, že byla prováděna retrospektivně a že u nádorové tkáně nebylo v době diagnózy provedeno imunohistochemické vyšetření MMR genů a stanovení MSI. Další limitací je také povaha analyzovaného souboru, který byl více než z poloviny tvořen pacientkami konsorcia CZEKANCA (291/527; 55,4 %), které se zaměřuje výzkum nádorové predispozice. Není tak možné vyloučit potenciální zkreslení výsledků ve prospěch vyšší prevalence nosiček PV. Abychom minimalizovali toto zkreslení, rozdělili jsme pacientky na základě indikačních kritérií a následně je analyzovali odděleně.

6. Závěr

6.1. Karcinom pankreatu

V souboru 226 pacientů/tek s PDAC jsme identifikovali celkem 8 % nosičů zárodečných PV ve známých predispozičních genech, nejčastěji v genu *BRCA2* (50 % všech nosičů). Mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* byly spojeny se signifikantně zvýšeným rizikem vzniku tohoto onemocnění. Zárodečné PV byly častější u pacientů s dalším tumorem v osobní anamnéze a s pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou (PDAC, karcinom prsu, ovaria, kolorekta, melanom). Přítomnost PV v genech podílejících se na opravě poškozené DNA cestou HR (*BRCA2*, *ATM*, *BRCA1* a další) byla spojena s lepší dobou přežití pacientů.

6.2. Karcinom endometria

V souboru 527 pacientek s EC jsme identifikovali více než 11 % nosiček PV v genech se známou nádorovou predispozicí, a to hlavně ve skupině genů pro LS (nejvíce *MSH6*) a genů pro HBOC (nejvíce *BRCA1*). Zárodečné PV v LS genech byly spojeny s výrazně zvýšeným rizikem vzniku EC a s nižším věkem v době diagnózy onemocnění. Riziko spojené s PV v HBOC genech *BRCA1*, *BRCA2* a *CHEK2* bylo nižší, nicméně stále signifikantně zvýšené. PV byly častější u pacientek s pozitivní osobní a rodinnou nádorovou anamnézou. EC pacientky, které splnily LS indikační kritéria, měly 5× vyšší riziko, že budou nosičkami zárodečné PV v LS genech oproti pacientkám, které tato indikační kritéria nesplňovaly. Nicméně, stále celkem 28,3 % nosiček PV v klinicky relevantních genech nebylo zachyceno současnými indikačními kritérii ke genetickému testování. Proto by bylo vhodné zařadit EC mezi indikační kritéria HBOC syndromu, ať už jako sekundární tumor u pacientky, nebo v rámci rodinného výskytu.

Identifikace zárodečných PV u pacientů s dědičnými nádorovými onemocněními může rozhodnout o rozsahu a volbě adekvátní chemoterapie (například založené na použití PARP inhibitorů nebo derivátů platiny) a o následné péči. Genetické testování příbuzných nosiče zárodečné PV navíc slouží k identifikaci vysoce rizikových pacientů, u nichž je možné zaměřit se na cílenou prevenci a včasnou diagnostiku souvisejících nádorových onemocnění.

7. Seznam použitých zkratek

1. LF UK	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
ACMG	American College of Medical Genetics
AGT	O6-alkylguanin-DNA-alkyltransferáza
BC	karcinom prsu
BER	base excision repair
BMI	body mass index
bp	pár bazí
CI	konfidenční interval
CNH	copy number high
CNL	copy number low
CNV	copy number variation
CRC	karcinom kolorekta
dAMP	deoxyadenosinmonofosfát
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA proteinkináza
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EC	karcinom endometria
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FA	Fanconiho anemie
FAMMM	syndrom familiárního melanomu
FAP	familiární adenomatózní polypóza
GATK	Genome Analysis Toolkit
GG-NER	global genome NER
HBOC	syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií
HP	hereditární pankreatitida
HR	homologní rekombinace
IGV	Integrative Genomics Viewer
IPMN	intraduktální papilární mucinózní neoplázie
kb	kilobáze
LS	Lynchův syndrom
MAF	minor allele frequency
MGMT	O6-methylguanin-DNA-methyltransferáza
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MMR	mismatch repair
mOS	střední doba přežití
MPS	syndrom karcinomu melanomu a pankreatu
MSI	mikrosatelitová nestabilita
N	počet
NBS	nijmegenský syndrom lomivosti
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NER	nucleotide excision repair

NGS	sekvenování nové generace
NHEJ	nehomologní spojování konců
OC	karcinom ovaria
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	riziko (podíl šancí)
PanIN	pankreatická intraepiteliální neoplázie
PARP	poly(ADP-riboza)polymeráza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDAC	pankreatický duktální adenokarcinom
PJS	Peutzův-Jeghersův syndrom
PMC	populační kontroly
PV	patogenní varianta
qPCR	kvantitativní PCR
RR	relativní riziko
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TC-NER	transcription-coupled NER
UTR	untranslated region
VCF	variant-call format
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
VUS	varianta nejasného významu
WT	wild type

8. Seznam použité literatury

- ABE, K., KITAGO, M., KITAGAWA, Y. & HIRASAWA, A. 2021. Hereditary pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol*, 26, 1784-1792.
- ADANK, M. A., VAN MIL, S. E., GILLE, J. J., WAISFISZ, Q. & MEIJERS-HEIJBOER, H. 2011. PALB2 analysis in BRCA2-like families. *Breast Cancer Res Treat*, 127, 357-62.
- ACHARYA, S., WILSON, T., GRADIA, S., KANE, M. F., GUERRETTE, S., MARSISCHKY, G. T., KOLODNER, R. & FISHEL, R. 1996. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13629-34.
- ALMEIDA, K. H. & SOBOL, R. W. 2007. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*, 6, 695-711.
- ARMSTRONG, S. A., SCHULTZ, C. W., AZIMI-SADJADI, A., BRODY, J. R. & PISHVAIAN, M. J. 2019. ATM Dysfunction in Pancreatic Adenocarcinoma and Associated Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther*, 18, 1899-1908.
- AXILBUND, J. E., ARGANI, P., KAMIYAMA, M., PALMISANO, E., RABEN, M., BORGES, M., BRUNE, K. A., GOGGINS, M., HRUBAN, R. H. & KLEIN, A. P. 2009. Absence of germline BRCA1 mutations in familial pancreatic cancer patients. *Cancer Biol Ther*, 8, 131-5.
- BAGLIETTO, L., LINDOR, N. M., DOWTY, J. G., WHITE, D. M., WAGNER, A., GOMEZ GARCIA, E. B., VRIENDS, A. H., DUTCH LYNCH SYNDROME STUDY, G., CARTWRIGHT, N. R., BARNETSON, R. A., FARRINGTON, S. M., TENESA, A., HAMPEL, H., BUCHANAN, D., ARNOLD, S., YOUNG, J., WALSH, M. D., JASS, J., MACRAE, F., ANTILL, Y., WINSHIP, I. M., GILES, G. G., GOLDBLATT, J., PARRY, S., SUTHERS, G., LEGGETT, B., BUTZ, M., ARONSON, M., POYNTER, J. N., BARON, J. A., LE MARCHAND, L., HAILE, R., GALLINGER, S., HOPPER, J. L., POTTER, J., DE LA CHAPELLE, A., VASEN, H. F., DUNLOP, M. G., THIBODEAU, S. N. & JENKINS, M. A. 2010. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 102, 193-201.
- BANIN, S., MOYAL, L., SHIEH, S., TAYA, Y., ANDERSON, C. W., CHESSA, L., SMORODINSKY, N. I., PRIVES, C., REISS, Y., SHILOH, Y. & ZIV, Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281, 1674-7.
- BANNO, K., KISU, I., YANOKURA, M., MASUDA, K., UEKI, A., KOBAYASHI, Y., HIRASAWA, A. & AOKI, D. 2013. Hereditary gynecological tumors associated with Peutz-Jeghers syndrome (Review). *Oncol Lett*, 6, 1184-1188.
- BARETTI, M. & LE, D. T. 2018. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther*, 189, 45-62.
- BARTSCH, D. K., SINA-FREY, M., LANG, S., WILD, A., GERDES, B., BARTH, P., KRESS, R., GRUTZMANN, R., COLOMBO-BENKMANN, M., ZIEGLER, A., HAHN, S. A., ROTHMUND, M. & RIEDER, H. 2002. CDKN2A germline mutations in familial pancreatic cancer. *Ann Surg*, 236, 730-7.
- BELLIDO, F., PINEDA, M., AIZA, G., VALDES-MAS, R., NAVARRO, M., PUENTE, D. A., PONS, T., GONZALEZ, S., IGLESIAS, S., DARDER, E., PINOL, V., SOTO, J. L., VALENCIA, A., BLANCO, I., URIOSTE, M., BRUNET, J., LAZARO, C., CAPELLA, G., PUENTE, X. S. & VALLE, L. 2016. POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported

cases and recommendations for genetic testing and surveillance. *Genet Med*, 18, 325-32.

- BENTLEY, D. R., BALASUBRAMANIAN, S., SWERDLOW, H. P., SMITH, G. P., MILTON, J., BROWN, C. G., HALL, K. P., EVERS, D. J., BARNES, C. L., BIGNELL, H. R., BOUTELL, J. M., BRYANT, J., CARTER, R. J., KEIRA CHEETHAM, R., COX, A. J., ELLIS, D. J., FLATBUSH, M. R., GORMLEY, N. A., HUMPHRAY, S. J., IRVING, L. J., KARBELASHVILI, M. S., KIRK, S. M., LI, H., LIU, X., MAISINGER, K. S., MURRAY, L. J., OBRADOVIC, B., OST, T., PARKINSON, M. L., PRATT, M. R., RASOLONJATOVO, I. M., REED, M. T., RIGATTI, R., RODIGHIERO, C., ROSS, M. T., SABOT, A., SANKAR, S. V., SCALLY, A., SCHROTH, G. P., SMITH, M. E., SMITH, V. P., SPIRIDOU, A., TORRANCE, P. E., TZONEV, S. S., VERMAAS, E. H., WALTER, K., WU, X., ZHANG, L., ALAM, M. D., ANASTASI, C., ANIEBO, I. C., BAILEY, D. M., BANCARZ, I. R., BANERJEE, S., BARBOUR, S. G., BAYBAYAN, P. A., BENOIT, V. A., BENSON, K. F., BEVIS, C., BLACK, P. J., BOODHUN, A., BRENNAN, J. S., BRIDGHAM, J. A., BROWN, R. C., BROWN, A. A., BUERMANN, D. H., BUNDU, A. A., BURROWS, J. C., CARTER, N. P., CASTILLO, N., CHIARA, E. C. M., CHANG, S., NEIL COOLEY, R., CRAKE, N. R., DADA, O. O., DIAKOU MAKOS, K. D., DOMINGUEZ-FERNANDEZ, B., EARNSHAW, D. J., EGBUJOR, U. C., ELMORE, D. W., ETCHIN, S. S., EWAN, M. R., FEDURCO, M., FRASER, L. J., FUENTES FAJARDO, K. V., SCOTT FUREY, W., GEORGE, D., GIETZEN, K. J., GODDARD, C. P., GOLDA, G. S., GRANIERI, P. A., GREEN, D. E., GUSTAFSON, D. L., HANSEN, N. F., HARNISH, K., HAUDENSCHILD, C. D., HEYER, N. I., HIMS, M. M., HO, J. T., HORGAN, A. M., et al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456, 53-9.
- BLANCO, A., DE LA HOYA, M., OSORIO, A., DIEZ, O., MIRAMAR, M. D., INFANTE, M., MARTINEZ-BOUZAS, C., TORRES, A., LASA, A., LLORT, G., BRUNET, J., GRANA, B., PEREZ SEGURA, P., GARCIA, M. J., GUTIERREZ-ENRIQUEZ, S., CARRACEDO, A., TEJADA, M. I., VELASCO, E. A., CALVO, M. T., BALMANA, J., BENITEZ, J., CALDES, T. & VEGA, A. 2013. Analysis of PALB2 gene in BRCA1/BRCA2 negative Spanish hereditary breast/ovarian cancer families with pancreatic cancer cases. *PLoS One*, 8, e67538.
- BOARDMAN, L. A., THIBODEAU, S. N., SCHAID, D. J., LINDOR, N. M., MCDONNELL, S. K., BURGART, L. J., AHLQUIST, D. A., PODRATZ, K. C., PITTELKOW, M. & HARTMANN, L. C. 1998. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med*, 128, 896-9.
- BORECKA, M., ZEMANKOVA, P., LHOTA, F., SOUKUPOVA, J., KLEIBLOVA, P., VOCKA, M., SOUCEK, P., TICHA, I., KLEIBL, Z. & JANATOVA, M. 2016. The c.657del5 variant in the NBN gene predisposes to pancreatic cancer. *Gene*, 587, 169-172.
- BOSETTI, C., ROSATO, V., LI, D., SILVERMAN, D., PETERSEN, G. M., BRACCI, P. M., NEALE, R. E., MUSCAT, J., ANDERSON, K., GALLINGER, S., OLSON, S. H., MILLER, A. B., BAS BUENO-DE-MESQUITA, H., SCELO, G., JANOUT, V., HOLCATOVA, I., LAGIOU, P., SERRAINO, D., LUCENTEFORTE, E., FABIANOVA, E., BAGHURST, P. A., ZATONSKI, W., FORETOVA, L., FONTHAM, E., BAMLET, W. R., HOLLY, E. A., NEGRI, E., HASSAN, M., PRIZMENT, A., COTTERCHIO, M., CLEARY, S., KURTZ, R. C., MAISONNEUVE, P., TRICHOPOULOS, D., POLESEL, J., DUELL, E. J., BOFFETTA, P., LA VECCHIA, C. & GHADIRIAN, P. 2014. Diabetes, antidiabetic

- medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann Oncol*, 25, 2065-2072.
- BRAND, R., BORAZANCI, E., SPEARE, V., DUDLEY, B., KARLOSKI, E., PETERS, M. L. B., STOBIE, L., BAHARY, N., ZEH, H., ZUREIKAT, A., HOGG, M., LEE, K., TSUNG, A., RHEE, J., OHR, J., SUN, W., LEE, J., MOSER, A. J., DELEONARDIS, K., KREJDOVSKY, J., DALTON, E., LADUCA, H., DOLINSKY, J., COLVIN, A., LIM, C., BLACK, M. H. & TUNG, N. 2018. Prospective study of germline genetic testing in incident cases of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 124, 3520-3527.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- BYCHKOVSKY, B. L., LO, M. T., YUSSUF, A., HORTON, C., RICHARDSON, M., LADUCA, H., GARBER, J. E. & RANA, H. Q. 2022. Prevalence and spectrum of pathogenic variants among patients with multiple primary cancers evaluated by clinical characteristics. *Cancer*, 128, 1275-1283.
- CADDOO, K. A., MANDELKER, D. L., MUKHERJEE, S., STEWART, C., DELAIR, D., RAVICHANDRAN, V., SRINIVASAN, P., HURLEY, D., KEMEL, Y., ARNOLD, A. G., SHEEHAN, M., PRADHAN, N., JOSEPH, V., CHI, D. S., GARDNER, G. J., JEWELL, E. L., LEITAO, M. M., JR., ROCHE, K. L., MUELLER, J. J., SONODA, Y., ZIVANOVIC, O., WALSH, M., CARLO, M. I., BERGER, M. F., HYMAN, D., ZHANG, L., ROBSON, M. E., OFFIT, K., AGHAJANIAN, C., RUSTUM, N. R. A. & STADLER, Z. 2019. Understanding inherited risk in unselected newly diagnosed patients with endometrial cancer. *JCO Precis Oncol*, 3, PO.18.00338.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N., KANDOTH, C., SCHULTZ, N., CHERNIACK, A. D., AKBANI, R., LIU, Y., SHEN, H., ROBERTSON, A. G., PASHTAN, I., SHEN, R., BENZ, C. C., YAU, C., LAIRD, P. W., DING, L., ZHANG, W., MILLS, G. B., KUCHERLAPATI, R., MARDIS, E. R. & LEVINE, D. A. 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 497, 67-73.
- CANTRELL, L. A., BLANK, S. V. & DUSKA, L. R. 2015. Uterine carcinosarcoma: A review of the literature. *Gynecol Oncol*, 137, 581-8.
- CAZACU, I. M., FARKAS, N., GARAMI, A., BALASKO, M., MOSDOSI, B., ALIZADEH, H., GYONGYI, Z., RAKONCZAY, Z., JR., VIGH, E., HABON, T., CZOPF, L., LAZARESCU, M. A., EROSS, B., SAHIN-TOTH, M. & HEGYI, P. 2018. Pancreatitis-Associated Genes and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pancreas*, 47, 1078-1086.
- CLAES, K., POPPE, B., COENE, I., PAEPE, A. D. & MESSIAEN, L. 2004. BRCA1 and BRCA2 germline mutation spectrum and frequencies in Belgian breast/ovarian cancer families. *Br J Cancer*, 90, 1244-51.
- COLOMBO, N., CREUTZBERG, C., AMANT, F., BOSSE, T., GONZALEZ-MARTIN, A., LEDERMANN, J., MARTH, C., NOUT, R., QUERLEU, D., MIRZA, M. R., SESSA, C. & GROUP, E.-E.-E. E. C. C. W. 2016. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 27, 16-41.
- COUCH, F. J., JOHNSON, M. R., RABE, K., BOARDMAN, L., MCWILLIAMS, R., DE ANDRADE, M. & PETERSEN, G. 2005. Germ line Fanconi anemia complementation group C mutations and pancreatic cancer. *Cancer Res*, 65, 383-6.

- CREMIN, C., LEE, M. K., HONG, Q., HOESCHEN, C., MACKENZIE, A., DIXON, K., MCCULLUM, M., NUK, J., KALLOGER, S., KARASINSKA, J., SCUDAMORE, C., KIM, P. T. W., DONNELLAN, F., LAM, E. C. S., LIM, H. J., NEBEN, C. L., STEDDEN, W., ZHOU, A. Y., SCHAEFFER, D. F., SUN, S., RENOUF, D. J. & SCHRADER, K. A. 2020. Burden of hereditary cancer susceptibility in unselected patients with pancreatic ductal adenocarcinoma referred for germline screening. *Cancer Med*, 9, 4004-4013.
- CUZICK, J., SESTAK, I., CAWTHORN, S., HAMED, H., HOLLI, K., HOWELL, A., FORBES, J. F. & INVESTIGATORS, I.-I. 2015. Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. *Lancet Oncol*, 16, 67-75.
- CYBULSKI, C., GORSKI, B., HUZARSKI, T., MASOJC, B., MIERZEJEWSKI, M., DEBNIAK, T., TEODORCZYK, U., BYRSKI, T., GRONWALD, J., MATYJASIK, J., ZLOWOCKA, E., LENNER, M., GRABOWSKA, E., NEJ, K., CASTANEDA, J., MEDREK, K., SZYMANSKA, A., SZYMANSKA, J., KURZAWSKI, G., SUCHY, J., OSZUREK, O., WITEK, A., NAROD, S. A. & LUBINSKI, J. 2004. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet*, 75, 1131-5.
- D'ANDREA, A. D. & GROMPE, M. 2003. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer*, 3, 23-34.
- DANIELS, M. S. & LU, K. H. 2016. Genetic predisposition in gynecologic cancers. *Semin Oncol*, 43, 543-547.
- DAVEE, T., CORONEL, E., PAPAFRAGKAKIS, C., THAIUDOM, S., LANKE, G., CHAKINALA, R. C., NOGUERAS GONZALEZ, G. M., BHUTANI, M. S., ROSS, W. A., WESTON, B. R. & LEE, J. H. 2018. Pancreatic cancer screening in high-risk individuals with germline genetic mutations. *Gastrointest Endosc*, 87, 1443-1450.
- DE' ANGELIS, G. L., BOTTARELLI, L., AZZONI, C., DE' ANGELIS, N., LEANDRO, G., DI MARIO, F., GAIANI, F. & NEGRI, F. 2018. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*, 89, 97-101.
- DE JONG, M. M., NOLTE, I. M., TE MEERMAN, G. J., VAN DER GRAAF, W. T., MULDER, M. J., VAN DER STEEGE, G., BRUINENBERG, M., SCHAAPVELD, M., NIESSEN, R. C., BERENDS, M. J., SIJMONS, R. H., HOFSTRA, R. M., DE VRIES, E. G. & KLEIBEUKER, J. H. 2005. Colorectal cancer and the CHEK2 1100delC mutation. *Genes Chromosomes Cancer*, 43, 377-82.
- DE JONGE, M. M., DE KROON, C. D., JENNER, D. J., OOSTING, J., DE HULLU, J. A., MOURITS, M. J. E., GOMEZ GARCIA, E. B., AUSEMS, M., MARGRIET COLLEE, J., VAN ENGELEN, K., VAN DE BEEK, I., HEBON, G., SMIT, V., ROOKUS, M. A., DE BOCK, G. H., VAN LEEUWEN, F. E., BOSSE, T., DEKKERS, O. M. & VAN ASPEREN, C. J. 2021. Endometrial Cancer Risk in Women With Germline BRCA1 or BRCA2 Mutations: Multicenter Cohort Study. *J Natl Cancer Inst*, 113, 1203-1211.
- DOI, H., KOYANO, S., MIYATAKE, S., NAKAJIMA, S., NAKAZAWA, Y., KUNII, M., TOMITA-KATSUMOTO, A., ODA, K., YAMAGUCHI, Y., FUKAI, R., IKEDA, S., KATO, R., OGATA, K., KUBOTA, S., HAYASHI, N., TAKAHASHI, K., TADA, M., TANAKA, K., NAKASHIMA, M., TSURUSAKI, Y., MIYAKE, N., SAITSU, H., OGI, T., AIHARA, M., TAKEUCHI, H., MATSUMOTO, N. & TANAKA, F. 2018. Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations. *J Hum Genet*, 63, 417-423.
- DOWTY, J. G., WIN, A. K., BUCHANAN, D. D., LINDOR, N. M., MACRAE, F. A., CLENDENNING, M., ANTILL, Y. C., THIBODEAU, S. N., CASEY, G., GALLINGER, S., MARCHAND, L. L., NEWCOMB, P. A., HAILE, R. W.,

- YOUNG, G. P., JAMES, P. A., GILES, G. G., GUNAWARDENA, S. R., LEGGETT, B. A., GATTAS, M., BOUSSIOUTAS, A., AHNEN, D. J., BARON, J. A., PARRY, S., GOLDBLATT, J., YOUNG, J. P., HOPPER, J. L. & JENKINS, M. A. 2013. Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. *Hum Mutat*, 34, 490-7.
- DUDLEY, B., KARLOSKI, E., MONZON, F. A., SINGHI, A. D., LINCOLN, S. E., BAHARY, N. & BRAND, R. E. 2018. Germline mutation prevalence in individuals with pancreatic cancer and a history of previous malignancy. *Cancer*, 124, 1691-1700.
- EARL, J., GALINDO-PUMARINO, C., ENCINAS, J., BARRETO, E., CASTILLO, M. E., PACHON, V., FERREIRO, R., RODRIGUEZ-GARROTE, M., GONZALEZ-MARTINEZ, S., RAMON, Y. C. T., DIAZ, L. R., CHIRIVELLA-GONZALEZ, I., RODRIGUEZ, M., DE CASTRO, E. M., GARCIA-SEISDEDOS, D., MUNOZ, G., ROSA, J. M. R., MARQUEZ, M., MALATS, N. & CARRATO, A. 2020. A comprehensive analysis of candidate genes in familial pancreatic cancer families reveals a high frequency of potentially pathogenic germline variants. *EBioMedicine*, 53, 102675.
- EDGE, S. B. & COMPTON, C. C. 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17, 1471-4.
- EINARSDOTTIR, K., HUMPHREYS, K., BONNARD, C., LI, Y., LI, Y., CHIA, K. S., LIU, E. T., HALL, P., LIU, J. & WEDREN, S. 2007. Effect of ATM, CHEK2 and ERBB2 TAGSNPs and haplotypes on endometrial cancer risk. *Hum Mol Genet*, 16, 154-64.
- ELSAYED, F. A., KETS, C. M., RUANO, D., VAN DEN AKKER, B., MENSENKAMP, A. R., SCHRUMPF, M., NIELSEN, M., WIJNEN, J. T., TOPS, C. M., LIGTENBERG, M. J., VASEN, H. F., HES, F. J., MORREAU, H. & VAN WEZEL, T. 2015. Germline variants in POLE are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer. *Eur J Hum Genet*, 23, 1080-4.
- ETEMAD, B. & WHITCOMB, D. C. 2001. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*, 120, 682-707.
- FALNES, P. O., KLUNGLAND, A. & ALSETH, I. 2007. Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience*, 145, 1222-32.
- FERLAY, J., COLOMBET, M., SOERJOMATARAM, I., MATHERS, C., PARKIN, D. M., PINEROS, M., ZNAOR, A. & BRAY, F. 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*, 144, 1941-1953.
- FISHEL, R. 2015. Mismatch repair. *J Biol Chem*, 290, 26395-403.
- FORETOVA, L., MACHACKOVA, E. & GAILLYOVA, R. 2022. *Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi*, Praha, Grada Publishing.
- FORETOVA, L., NAVRATILOVA, M., SVOBODA, M., VASICKOVA, P., STAHLLOVA, E. H., HAZOVA, J., KLEIBLOVA, P., KLEIBL, Z., MACHACKOVA, E., PALACOVA, M. & PETRAKOVA, K. 2019. Recommendations for Preventive Care for Women with Rare Genetic Cause of Breast and Ovarian Cancer. *Klin Onkol*, 32, 6-13.
- FOULKES, W. D. 2008. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med*, 359, 2143-53.
- FOUNTZILAS, E., ELIADES, A., KOLIOU, G. A., ACHILLEOS, A., LOIZIDES, C., TSANGARAS, K., PECTASIDES, D., SGOUROS, J., PAPAKOSTAS, P., RALLIS, G., PSYRRI, A., PAPADIMITRIOU, C., OIKONOMOPOULOS, G.,

- FERENTINOS, K., KOUMARIANOU, A., ZARKAVELIS, G., DERVENIS, C., ARAVANTINOS, G., BAFALOUKOS, D., KOSMIDIS, P., PAPAXOINIS, G., THEOCHARI, M., VARTHALITIS, I., KENTEPOZIDIS, N., RIGAKOS, G., SARIDAKI, Z., NIKOLAIDI, A., CHRISTOPOULOU, A., FOSTIRA, F., SAMANTAS, E., KYPRI, E., IOANNIDES, M., KOUMBARIS, G., FOUNTZILAS, G. & PATSALIS, P. C. 2021. Clinical Significance of Germline Cancer Predisposing Variants in Unselected Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*, 13, 198.
- GEARY, J., SASIENI, P., HOULSTON, R., IZATT, L., EELES, R., PAYNE, S. J., FISHER, S. & HODGSON, S. V. 2008. Gene-related cancer spectrum in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Fam Cancer*, 7, 163-72.
- GENTILUOMO, M., CANZIAN, F., NICOLINI, A., GEMIGNANI, F., LANDI, S. & CAMPA, D. 2022. Germline genetic variability in pancreatic cancer risk and prognosis. *Semin Cancer Biol*, 79, 105-131.
- GHIORZO, P., FORNARINI, G., SCIALLERO, S., BATTISTUZZI, L., BELLI, F., BERNARD, L., BONELLI, L., BORGONOVO, G., BRUNO, W., DE CIAN, F., DECENSI, A., FILAURO, M., FARAVELLI, F., GOZZA, A., GARGIULO, S., MARIETTE, F., NASTI, S., PASTORINO, L., QUEIROLO, P., SAVARINO, V., VARESCO, L., SCARRA, G. B. & GENOA PANCREATIC CANCER STUDY, G. 2012. CDKN2A is the main susceptibility gene in Italian pancreatic cancer families. *J Med Genet*, 49, 164-70.
- GIARDIELLO, F. M., BRENSINGER, J. D., TERSMETTE, A. C., GOODMAN, S. N., PETERSEN, G. M., BOOKER, S. V., CRUZ-CORREA, M. & OFFERHAUS, J. A. 2000. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*, 119, 1447-53.
- GIARDIELLO, F. M., OFFERHAUS, G. J., LEE, D. H., KRUSH, A. J., TERSMETTE, A. C., BOOKER, S. V., KELLEY, N. C. & HAMILTON, S. R. 1993. Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut*, 34, 1394-6.
- GIARDIELLO, F. M., WELSH, S. B., HAMILTON, S. R., OFFERHAUS, G. J., GITTELSON, A. M., BOOKER, S. V., KRUSH, A. J., YARDLEY, J. H. & LUK, G. D. 1987. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med*, 316, 1511-4.
- GOGGINS, M., OFFERHAUS, G. J., HILGERS, W., GRIFFIN, C. A., SHEKHER, M., TANG, D., SOHN, T. A., YEO, C. J., KERN, S. E. & HRUBAN, R. H. 1998. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol*, 152, 1501-7.
- GOGGINS, M., OVERBEEK, K. A., BRAND, R., SYNGAL, S., DEL CHIARO, M., BARTSCH, D. K., BASSI, C., CARRATO, A., FARRELL, J., FISHMAN, E. K., FOCKENS, P., GRESS, T. M., VAN HOOFT, J. E., HRUBAN, R. H., KASTRINOS, F., KLEIN, A., LENNON, A. M., LUCAS, A., PARK, W., RUSTGI, A., SIMEONE, D., STOFFEL, E., VASEN, H. F. A., CAHEN, D. L., CANTO, M. I., BRUNO, M. & INTERNATIONAL CANCER OF THE PANCREAS SCREENING, C. 2020. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut*, 69, 7-17.
- GOLAN, T., HAMMEL, P., RENI, M., VAN CUTSEM, E., MACARULLA, T., HALL, M. J., PARK, J. O., HOCHHAUSER, D., ARNOLD, D., OH, D. Y., REINACHER-

- SCHICK, A., TORTORA, G., ALGUL, H., O'REILLY, E. M., MCGUINNESS, D., CUI, K. Y., SCHLIENGER, K., LOCKER, G. Y. & KINDLER, H. L. 2019. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*, 381, 317-327.
- GOLDSTEIN, A. M., FRASER, M. C., STRUEWING, J. P., HUSSUSSIAN, C. J., RANADE, K., ZAMETKIN, D. P., FONTAINE, L. S., ORGANIC, S. M., DRACOPOLI, N. C., CLARK, W. H., JR. & ET AL. 1995. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *N Engl J Med*, 333, 970-4.
- GOLDSTEIN, J. B., ZHAO, L., WANG, X., GHELMAN, Y., OVERMAN, M. J., JAVLE, M. M., SHROFF, R. T., VARADHACHARY, G. R., WOLFF, R. A., MCALLISTER, F., FUTREAL, A. & FOGELMAN, D. R. 2020. Germline DNA Sequencing Reveals Novel Mutations Predictive of Overall Survival in a Cohort of Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*, 26, 1385-1394.
- GRANT, R. C., SELANDER, I., CONNOR, A. A., SELVARAJAH, S., BORGIDA, A., BRIOLLAIS, L., PETERSEN, G. M., LERNER-ELLIS, J., HOLTER, S. & GALLINGER, S. 2015. Prevalence of germline mutations in cancer predisposition genes in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 148, 556-64.
- GREEN, A. K., FEINBERG, J. & MAKKER, V. 2020. A Review of Immune Checkpoint Blockade Therapy in Endometrial Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 40, 1-7.
- HAHN, S. A., GREENHALF, B., ELLIS, I., SINA-FREY, M., RIEDER, H., KORTE, B., GERDES, B., KRESS, R., ZIEGLER, A., RAEBURN, J. A., CAMBRA, D., GRUTZMANN, R., REHDER, H., ROTHMUND, M., SCHMIEGEL, W., NEOPTOLEMOS, J. P. & BARTSCH, D. K. 2003. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 95, 214-21.
- HANAHAHAN, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12, 31-46.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANSON, C. A. & MILLER, J. R. 2005. Non-traditional roles for the Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor protein. *Gene*, 361, 1-12.
- HARALDSDOTTIR, S., HAMPEL, H., TOMSIC, J., FRANKEL, W. L., PEARLMAN, R., DE LA CHAPELLE, A. & PRITCHARD, C. C. 2014. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology*, 147, 1308-1316 e1.
- HARINCK, F., KLUIJT, I., VAN MIL, S. E., WAISFISZ, Q., VAN OS, T. A., AALFS, C. M., WAGNER, A., OLDERODE-BERENDS, M., SIJMONS, R. H., KUIPERS, E. J., POLEY, J. W., FOCKENS, P. & BRUNO, M. J. 2012. Routine testing for PALB2 mutations in familial pancreatic cancer families and breast cancer families with pancreatic cancer is not indicated. *Eur J Hum Genet*, 20, 577-9.
- HE, J., AHUJA, N., MAKARY, M. A., CAMERON, J. L., ECKHAUSER, F. E., CHOTI, M. A., HRUBAN, R. H., PAWLIK, T. M. & WOLFGANG, C. L. 2014. 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades. *HPB (Oxford)*, 16, 83-90.
- HEZEL, A. F., KIMMELMAN, A. C., STANGER, B. Z., BARDEESY, N. & DEPINHO, R. A. 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20, 1218-49.
- HOFSTATTER, E. W., DOMCHEK, S. M., MIRON, A., GARBER, J., WANG, M., COMPONESCHI, K., BOGHOSSIAN, L., MIRON, P. L., NATHANSON, K. L. &

- TUNG, N. 2011. PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer. *Fam Cancer*, 10, 225-31.
- HRUBAN, R. H., KLEIN, A. P., ESHLEMAN, J. R., AXILBUND, J. E. & GOGGINS, M. 2007. Familial pancreatic cancer: from genes to improved patient care. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 1, 81-8.
- HSIEH, P. & YAMANE, K. 2008. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev*, 129, 391-407.
- HU, C., LADUCA, H., SHIMELIS, H., POLLEY, E. C., LILYQUIST, J., HART, S. N., NA, J., THOMAS, A., LEE, K. Y., DAVIS, B. T., BLACK, M. H., PESARAN, T., GOLDGAR, D. E., DOLINSKY, J. S. & COUCH, F. J. 2018. Multigene Hereditary Cancer Panels Reveal High-Risk Pancreatic Cancer Susceptibility Genes. *JCO Precis Oncol*, 2, PO.17.00291.
- HUTH, C., KLOOR, M., VOIGT, A. Y., BOZUKOVA, G., EVERS, C., GASPAR, H., TARIVERDIAN, M., SCHIRMACHER, P., VON KNEBEL DOEBERITZ, M. & BLAKER, H. 2012. The molecular basis of EPCAM expression loss in Lynch syndrome-associated tumors. *Mod Pathol*, 25, 911-6.
- CHANG, H. H. Y., PANNUNZIO, N. R., ADACHI, N. & LIEBER, M. R. 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 495-506.
- CHARI, S. T., LEIBSON, C. L., RABE, K. G., TIMMONS, L. J., RANSOM, J., DE ANDRADE, M. & PETERSEN, G. M. 2008. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology*, 134, 95-101.
- CHATTERJEE, N. & WALKER, G. C. 2017. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*, 58, 235-263.
- CHRZANOWSKA, K. H., GREGOREK, H., DEMBOWSKA-BAGINSKA, B., KALINA, M. A. & DIGWEED, M. 2012. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis*, 7, 13.
- IODICE, S., GANDINI, S., MAISONNEUVE, P. & LOWENFELS, A. B. 2008. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg*, 393, 535-45.
- ISHIDA, H., ISHIBASHI, K. & IWAMA, T. 2018. Malignant tumors associated with juvenile polyposis syndrome in Japan. *Surg Today*, 48, 253-263.
- JOHNATTY, S. E., PESARAN, T., DOLINSKY, J., YUSSUF, A., LADUCA, H., JAMES, P. A., O'MARA, T. A. & SPURDLE, A. B. 2021. Case-case analysis addressing ascertainment bias for multigene panel testing implicates BRCA1 and PALB2 in endometrial cancer. *Hum Mutat*, 42, 1265-1278.
- JONES, S., HRUBAN, R. H., KAMIYAMA, M., BORGES, M., ZHANG, X., PARSONS, D. W., LIN, J. C., PALMISANO, E., BRUNE, K., JAFFEE, E. M., IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., MAITRA, A., PARMIGIANI, G., KERN, S. E., VELCULESCU, V. E., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., ESHLEMAN, J. R., GOGGINS, M. & KLEIN, A. P. 2009. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science*, 324, 217.
- JONES, S., ZHANG, X., PARSONS, D. W., LIN, J. C., LEARY, R. J., ANGENENDT, P., MANKOO, P., CARTER, H., KAMIYAMA, H., JIMENO, A., HONG, S. M., FU, B., LIN, M. T., CALHOUN, E. S., KAMIYAMA, M., WALTER, K., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., HARTIGAN, J., SMITH, D. R., HIDALGO, M., LEACH, S. D., KLEIN, A. P., JAFFEE, E. M., GOGGINS, M., MAITRA, A., IACOBUZIO-DONAHUE, C., ESHLEMAN, J. R., KERN, S. E., HRUBAN, R. H., KARCHIN, R., PAPADOPOULOS, N., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B.,

- VELCULESCU, V. E. & KINZLER, K. W. 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321, 1801-6.
- KAINA, B., CHRISTMANN, M., NAUMANN, S. & ROOS, W. P. 2007. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, 6, 1079-99.
- KAMIHARA, J., RANA, H. Q. & GARBER, J. E. 2014. Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat*, 35, 654-62.
- KARPEL, H. C., CHERN, J. Y., SMITH, J. M., SMITH, A. J. & POTHURI, B. 2022. Utility of germline multi-gene panel testing in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 165, 546-551.
- KASTRINOS, F., MUKHERJEE, B., TAYOB, N., WANG, F., SPARR, J., RAYMOND, V. M., BANDIPALLIAM, P., STOFFEL, E. M., GRUBER, S. B. & SYNGAL, S. 2009. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA*, 302, 1790-5.
- KEMPERS, M. J., KUIPER, R. P., OCKELOEN, C. W., CHAPPUIS, P. O., HUTTER, P., RAHNER, N., SCHACKERT, H. K., STEINKE, V., HOLINSKI-FEDER, E., MORAK, M., KLOOR, M., BUTTNER, R., VERWIEL, E. T., VAN KRIEKEN, J. H., NAGTEGAAL, I. D., GOOSSENS, M., VAN DER POST, R. S., NIESSEN, R. C., SIJMONS, R. H., KLUIJT, I., HOGERVORST, F. B., LETER, E. M., GILLE, J. J., AALFS, C. M., REDEKER, E. J., HES, F. J., TOPS, C. M., VAN NESSELROOIJ, B. P., VAN GIJN, M. E., GOMEZ GARCIA, E. B., ECCLES, D. M., BUNYAN, D. J., SYNGAL, S., STOFFEL, E. M., CULVER, J. O., PALOMARES, M. R., GRAHAM, T., VELSER, L., PAPP, J., OLAH, E., CHAN, T. L., LEUNG, S. Y., VAN KESSEL, A. G., KIEMENEY, L. A., HOOPERBRUGGE, N. & LIGTENBERG, M. J. 2011. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol*, 12, 49-55.
- KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386, 761, 763.
- KITSON, S. J., BAFLIGIL, C., RYAN, N. A. J., LALLOO, F., WOODWARD, E. R., CLAYTON, R. D., EDMONDSON, R. J., BOLTON, J., CROSBIE, E. J. & EVANS, D. G. 2020. BRCA1 and BRCA2 pathogenic variant carriers and endometrial cancer risk: A cohort study. *Eur J Cancer*, 136, 169-175.
- KLEEFF, J., KORC, M., APTE, M., LA VECCHIA, C., JOHNSON, C. D., BIANKIN, A. V., NEALE, R. E., TEMPERO, M., TUVESON, D. A., HRUBAN, R. H. & NEOPTOLEMOS, J. P. 2016. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16022.
- KLEIBLOVA, P., STOLAROVA, L., KRIZOVA, K., LHOTA, F., HOJNY, J., ZEMANKOVA, P., HAVRANEK, O., VOCKA, M., CERNA, M., LHOTOVA, K., BORECKA, M., JANATOVA, M., SOUKUPOVA, J., SEVCIK, J., ZIMOVJANOVA, M., KOTLAS, J., PANCZAK, A., VESELA, K., CERVENKOVA, J., SCHNEIDEROVA, M., BUROCZIOVA, M., BURDOVA, K., STRANECKY, V., FORETOVA, L., MACHACKOVA, E., TAVANDZIS, S., KMOCH, S., MACUREK, L. & KLEIBL, Z. 2019. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer*, 145, 1782-1797.
- KLEIN, A. P. 2012. Genetic susceptibility to pancreatic cancer. *Mol Carcinog*, 51, 14-24.
- KLEIN, A. P., BRUNE, K. A., PETERSEN, G. M., GOGGINS, M., TERSMETTE, A. C., OFFERHAUS, G. J., GRIFFIN, C., CAMERON, J. L., YEO, C. J., KERN, S. & HRUBAN, R. H. 2004. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res*, 64, 2634-8.

- KNUDSON, A. G., JR. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 820-3.
- KONDO, E., HORII, A. & FUKUSHIGE, S. 2001. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res*, 29, 1695-702.
- LADUCA, H., POLLEY, E. C., YUSSUF, A., HOANG, L., GUTIERREZ, S., HART, S. N., YADAV, S., HU, C., NA, J., GOLDFAR, D. E., FULK, K., SMITH, L. P., HORTON, C., PROFATO, J., PESARAN, T., GAU, C. L., PRONOLD, M., DAVIS, B. T., CHAO, E. C., COUCH, F. J. & DOLINSKY, J. S. 2020. A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genet Med*, 22, 407-415.
- LE, D. T., DURHAM, J. N., SMITH, K. N., WANG, H., BARTLETT, B. R., AULAKH, L. K., LU, S., KEMBERLING, H., WILT, C., LUBER, B. S., WONG, F., AZAD, N. S., RUCKI, A. A., LAHERU, D., DONEHOWER, R., ZAHEER, A., FISHER, G. A., CROCENZI, T. S., LEE, J. J., GRETEN, T. F., DUFFY, A. G., CIOMBOR, K. K., EYRING, A. D., LAM, B. H., JOE, A., KANG, S. P., HOLDHOFF, M., DANILOVA, L., COPE, L., MEYER, C., ZHOU, S., GOLDBERG, R. M., ARMSTRONG, D. K., BEVER, K. M., FADER, A. N., TAUBE, J., HOUSSEAU, F., SPETZLER, D., XIAO, N., PARDOLL, D. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., ESHLEMAN, J. R., VOGELSTEIN, B., ANDERS, R. A. & DIAZ, L. A., JR. 2017. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, 357, 409-413.
- LEE, Y. C., MILNE, R. L., LHEUREUX, S., FRIEDLANDER, M., MCLACHLAN, S. A., MARTIN, K. L., BERNARDINI, M. Q., SMITH, C., PICKEN, S., NESCI, S., HOPPER, J. L., PHILLIPS, K. A. & KATHLEEN CUNINGHAM FOUNDATION CONSORTIUM FOR RESEARCH INTO FAMILIAL BREAST, C. 2017. Risk of uterine cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Eur J Cancer*, 84, 114-120.
- LENER, M. R., SCOTT, R. J., KLUZNIAK, W., BASZUK, P., CYBULSKI, C., WIECHOWSKA-KOZLOWSKA, A., HUZARSKI, T., BYRSKI, T., KLADNY, J., PIETRZAK, S., SOLUCH, A., JAKUBOWSKA, A. & LUBINSKI, J. 2016. Do founder mutations characteristic of some cancer sites also predispose to pancreatic cancer? *Int J Cancer*, 139, 601-6.
- LEON-CASTILLO, A., BRITTON, H., MCCONECHY, M. K., MCALPINE, J. N., NOUT, R., KOMMOSS, S., BRUCKER, S. Y., CARLSON, J. W., EPSTEIN, E., RAU, T. T., BOSSE, T., CHURCH, D. N. & GILKS, C. B. 2020. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol*, 250, 323-335.
- LEVINE, M. D., PEARLMAN, R., HAMPEL, H., COSGROVE, C., COHN, D., CHASSEN, A., SUAREZ, A., BARRINGTON, D. A., MCELROY, J. P., WAGGONER, S., NAKAYAMA, J., BILLINGSLEY, C., RESNICK, K., ANDREWS, S., SINGH, S., JENISON, E., CLEMENTS, A., NEFF, R., GOODFELLOW, P. J., OHIO, P. & TREATMENT OF ENDOMETRIAL CANCER INITIATIVE STUDY, G. 2021. Up-Front Multigene Panel Testing for Cancer Susceptibility in Patients With Newly Diagnosed Endometrial Cancer: A Multicenter Prospective Study. *JCO Precis Oncol*, 5, 1588-1602.
- LHOTOVA, K., STOLAROVA, L., ZEMANKOVA, P., VOCKA, M., JANATOVA, M., BORECKA, M., CERNA, M., JELINKOVA, S., KRAL, J., VOLKOVA, Z., URBANOVA, M., KLEIBLOVA, P., MACHACKOVA, E., FORETOVA, L., HAZOVA, J., VASICKOVA, P., LHOTA, F., KOUDOVA, M., CERNA, L.,

- TAVANDZIS, S., INDRAKOVA, J., HRUSKOVA, L., KOSAROVA, M., VRTEL, R., STRANECKY, V., KMOCH, S., ZIKAN, M., MACUREK, L., KLEIBL, Z. & SOUKUPOVA, J. 2020. Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*, 12, 956.
- LIAO, C., ZHANG, D., MUNGO, C., TOMPKINS, D. A. & ZEIDAN, A. M. 2014. Is diabetes mellitus associated with increased incidence and disease-specific mortality in endometrial cancer? A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Gynecol Oncol*, 135, 163-71.
- LLACH, J., CARBALLAL, S. & MOREIRA, L. 2020. Familial Pancreatic Cancer: Current Perspectives. *Cancer Manag Res*, 12, 743-758.
- LONG, B., LILYQUIST, J., WEAVER, A., HU, C., GNANAOLIVU, R., LEE, K. Y., HART, S. N., POLLEY, E. C., BAKKUM-GAMEZ, J. N., COUCH, F. J. & DOWDY, S. C. 2019. Cancer susceptibility gene mutations in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 152, 20-25.
- LOWENFELS, A. B., MAISONNEUVE, P., CAVALLINI, G., AMMANN, R. W., LANKISCH, P. G., ANDERSEN, J. R., DIMAGNO, E. P., ANDREN-SANDBERG, A. & DOMELLOF, L. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med*, 328, 1433-7.
- LOWENFELS, A. B., MAISONNEUVE, P., DIMAGNO, E. P., ELITSUR, Y., GATES, L. K., JR., PERRAULT, J. & WHITCOMB, D. C. 1997. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 89, 442-6.
- LOWENFELS, A. B., MAISONNEUVE, P. & WHITCOMB, D. C. 2000. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am*, 84, 565-73.
- LOWERY, M. A., WONG, W., JORDAN, E. J., LEE, J. W., KEMEL, Y., VIJAI, J., MANDELKER, D., ZEHIR, A., CAPANU, M., SALO-MULLEN, E., ARNOLD, A. G., YU, K. H., VARGHESE, A. M., KELSEN, D. P., BRENNER, R., KAUFMANN, E., RAVICHANDRAN, V., MUKHERJEE, S., BERGER, M. F., HYMAN, D. M., KLIMSTRA, D. S., ABOU-ALFA, G. K., TJAN, C., COVINGTON, C., MAYNARD, H., ALLEN, P. J., ASKAN, G., LEACH, S. D., IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., ROBSON, M. E., OFFIT, K., STADLER, Z. K. & O'REILLY, E. M. 2018. Prospective Evaluation of Germline Alterations in Patients With Exocrine Pancreatic Neoplasms. *J Natl Cancer Inst*, 110, 1067-1074.
- LU, K. H., DINH, M., KOHLMANN, W., WATSON, P., GREEN, J., SYNGAL, S., BANDIPALLIAM, P., CHEN, L. M., ALLEN, B., CONRAD, P., TERDIMAN, J., SUN, C., DANIELS, M., BURKE, T., GERSHENSON, D. M., LYNCH, H., LYNCH, P. & BROADDUS, R. R. 2005. Gynecologic cancer as a "sentinel cancer" for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Obstet Gynecol*, 105, 569-74.
- LYNCH, H. T., BRAND, R. E., HOGG, D., DETERS, C. A., FUSARO, R. M., LYNCH, J. F., LIU, L., KNEZETIC, J., LASSAM, N. J., GOGGINS, M. & KERN, S. 2002. Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer*, 94, 84-96.
- LYNCH, H. T., DETERS, C. A., LYNCH, J. F. & BRAND, R. E. 2004. Familial pancreatic carcinoma in Jews. *Fam Cancer*, 3, 233-40.
- LYNCH, H. T., LANSPA, S. J., BOMAN, B. M., SMYRK, T., WATSON, P., LYNCH, J. F., LYNCH, P. M., CRISTOFARO, G., BUFO, P., TAURO, A. V. & ET AL. 1988.

- Hereditary nonpolyposis colorectal cancer--Lynch syndromes I and II. *Gastroenterol Clin North Am*, 17, 679-712.
- LYNCH, H. T. & LYNCH, J. F. 1993. The Lynch syndromes. *Curr Opin Oncol*, 5, 687-96.
- MAKKER, V., MACKAY, H., RAY-COQUARD, I., LEVINE, D. A., WESTIN, S. N., AOKI, D. & OAKNIN, A. 2021. Endometrial cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 7, 88.
- MANNUCCI, A., ZUPPARDO, R. A., CRIPPA, S., CARRERA, P., PATRICELLI, M. G., RUSSO RAUCCI, A., CALABRESE, F., LAZAREVIC, D., GIANNESE, F., TONON, G., FERRARI, M., TESTONI, P. A. & CAVESTRO, G. M. 2020. MSH6 gene pathogenic variant identified in familial pancreatic cancer in the absence of colon cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 32, 345-349.
- MARTEIJN, J. A., LANS, H., VERMEULEN, W. & HOEIJMAKERS, J. H. 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 465-81.
- MASUDA, K., BANNO, K., HIRASAWA, A., YANOKURA, M., TSUJI, K., KOBAYASHI, Y., KISU, I., UEKI, A., NOMURA, H., TOMINAGA, E., SUSUMU, N. & AOKI, D. 2012. Relationship of lower uterine segment cancer with Lynch syndrome: a novel case with an hMLH1 germline mutation. *Oncol Rep*, 28, 1537-43.
- MATSUBAYASHI, H. 2011. Familial pancreatic cancer and hereditary syndromes: screening strategy for high-risk individuals. *J Gastroenterol*, 46, 1249-59.
- MCWILLIAMS, R. R., PETERSEN, G. M., RABE, K. G., HOLTEGAARD, L. M., LYNCH, P. J., BISHOP, M. D. & HIGHSMITH, W. E., JR. 2010. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations and risk for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 116, 203-9.
- METZKER, M. L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11, 31-46.
- MILLER, D. T., LEE, K., CHUNG, W. K., GORDON, A. S., HERMAN, G. E., KLEIN, T. E., STEWART, D. R., AMENDOLA, L. M., ADELMAN, K., BALE, S. J., GOLLOB, M. H., HARRISON, S. M., HERSHBERGER, R. E., MCKELVEY, K., RICHARDS, C. S., VLANGOS, C. N., WATSON, M. S., MARTIN, C. L. & GROUP, A. S. F. W. 2021. ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*, 23, 1381-1390.
- MOCCI, E., MILNE, R. L., MENDEZ-VILLAMIL, E. Y., HOPPER, J. L., JOHN, E. M., ANDRULIS, I. L., CHUNG, W. K., DALY, M., BUYS, S. S., MALATS, N. & GOLDFAR, D. E. 2013. Risk of pancreatic cancer in breast cancer families from the breast cancer family registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22, 803-11.
- MOLLER, P., SEPPALA, T. T., BERNSTEIN, I., HOLINSKI-FEDER, E., SALA, P., GARETH EVANS, D., LINDBLOM, A., MACRAE, F., BLANCO, I., SIJMONS, R. H., JEFFRIES, J., VASEN, H. F. A., BURN, J., NAKKEN, S., HOVIG, E., RODLAND, E. A., THARMARATNAM, K., DE VOS TOT NEDERVEEN CAPPEL, W. H., HILL, J., WIJNEN, J. T., JENKINS, M. A., GREEN, K., LALLOO, F., SUNDE, L., MINTS, M., BERTARIO, L., PINEDA, M., NAVARRO, M., MORAK, M., RENKONEN-SINISALO, L., VALENTIN, M. D., FRAYLING, I. M., PLAZZER, J. P., PYLVANAINEN, K., GENUARDI, M., MECKLIN, J. P., MOESLEIN, G., SAMPSON, J. R., CAPELLA, G. & MALLORCA, G. 2018. Cancer risk and survival in path_MMR carriers by gene and gender up to 75 years of age: a report from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Gut*, 67, 1306-1316.
- MOSKALUK, C. A., HRUBAN, H., LIETMAN, A., SMYRK, T., FUSARO, L., FUSARO, R., LYNCH, J., YEO, C. J., JACKSON, C. E., LYNCH, H. T. & KERN, S. E. 1998.

- Novel germline p16(INK4) allele (Asp145Cys) in a family with multiple pancreatic carcinomas. Mutations in brief no. 148. Online. *Hum Mutat*, 12, 70.
- MURPHY, K. M., BRUNE, K. A., GRIFFIN, C., SOLLENBERGER, J. E., PETERSEN, G. M., BANSAL, R., HRUBAN, R. H. & KERN, S. E. 2002. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res*, 62, 3789-93.
- NALEPA, G. & CLAPP, D. W. 2018. Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship. *Nat Rev Cancer*, 18, 168-185.
- NATALE, V. & RAQUER, H. 2017. Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex. *Orphanet J Rare Dis*, 12, 65.
- NIEUWENHUIS, M. H., KETS, C. M., MURPHY-RYAN, M., YNTEMA, H. G., EVANS, D. G., COLAS, C., MOLLER, P., HES, F. J., HODGSON, S. V., OLDERODEBERENDS, M. J., ARETZ, S., HEINIMANN, K., GOMEZ GARCIA, E. B., DOUGLAS, F., SPIGELMAN, A., TIMSHEL, S., LINDOR, N. M. & VASEN, H. F. 2014. Cancer risk and genotype-phenotype correlations in PTEN hamartoma tumor syndrome. *Fam Cancer*, 13, 57-63.
- NICHOLS, K. E., MALKIN, D., GARBER, J. E., FRAUMENI, J. F., JR. & LI, F. P. 2001. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 83-7.
- NOVOTNY, J., VITEK, P. & KLEIBL, Z. 2019. *Onkologie v klinické praxi*, Praha, Mladá fronta a.s.
- OVERBEEK, K. A., RODRIGUEZ-GIRONDO, M. D., WAGNER, A., VAN DER STOEP, N., VAN DEN AKKER, P. C., OOSTERWIJK, J. C., VAN OS, T. A., VAN DER KOLK, L. E., VASEN, H. F. A., HES, F. J., CAHEN, D. L., BRUNO, M. J. & POTJER, T. P. 2021. Genotype-phenotype correlations for pancreatic cancer risk in Dutch melanoma families with pathogenic CDKN2A variants. *J Med Genet*, 58, 264-269.
- OZCELIK, H., SCHMOCKER, B., DI NICOLA, N., SHI, X. H., LANGER, B., MOORE, M., TAYLOR, B. R., NAROD, S. A., DARLINGTON, G., ANDRULIS, I. L., GALLINGER, S. & REDSTON, M. 1997. Germline BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish pancreatic cancer patients. *Nat Genet*, 16, 17-8.
- PALLES, C., CAZIER, J. B., HOWARTH, K. M., DOMINGO, E., JONES, A. M., BRODERICK, P., KEMP, Z., SPAIN, S. L., GUARINO, E., SALGUERO, I., SHERBORNE, A., CHUBB, D., CARVAJAL-CARMONA, L. G., MA, Y., KAUR, K., DOBBINS, S., BARCLAY, E., GORMAN, M., MARTIN, L., KOVAC, M. B., HUMPHRAY, S., CONSORTIUM, C., CONSORTIUM, W. G. S., LUCASSEN, A., HOLMES, C. C., BENTLEY, D., DONNELLY, P., TAYLOR, J., PETRIDIS, C., ROYLANCE, R., SAWYER, E. J., KERR, D. J., CLARK, S., GRIMES, J., KEARSEY, S. E., THOMAS, H. J., MCVEAN, G., HOULSTON, R. S. & TOMLINSON, I. 2013. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet*, 45, 136-44.
- PECORELLI, S. 2009. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*, 105, 103-4.
- PEREZ-CABORNERO, L., INFANTE SANZ, M., VELASCO SAMPEDRO, E., LASTRA ARAS, E., ACEDO BECARES, A., MINER PINO, C. & DURAN DOMINGUEZ, M. 2011. Frequency of rearrangements in Lynch syndrome cases associated with MSH2: characterization of a new deletion involving both EPCAM and the 5' part of MSH2. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 1556-62.

- PETERLONGO, P., CATUCCI, I., PASQUINI, G., VERDERIO, P., PEISSEL, B., BARILE, M., VARESCO, L., RIBONI, M., FORTUZZI, S., MANOUKIAN, S. & RADICE, P. 2011. PALB2 germline mutations in familial breast cancer cases with personal and family history of pancreatic cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 126, 825-8.
- PFEIFFER, P., GOEDECKE, W. & OBE, G. 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 15, 289-302.
- PLEVOVA, P., NOVOTNY, J., SACHLOVA, M., KREPELOVA, A. & FORETOVA, L. 2009. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Klin Onkol*, 22, S12-5.
- POHLREICH, P., ZIKAN, M., STRIBRNA, J., KLEIBL, Z., JANATOVA, M., KOTLAS, J., ZIDOVSKA, J., NOVOTNY, J., PETRUZELKA, L., SZABO, C. & MATOUS, B. 2005. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res*, 7, R728-36.
- RAGLAN, O., KALLIALA, I., MARKOZANNES, G., CIVIDINI, S., GUNTER, M. J., NAUTIYAL, J., GABRA, H., PARASKEVAIDIS, E., MARTIN-HIRSCH, P., TSILIDIS, K. K. & KYRGIU, M. 2019. Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. *Int J Cancer*, 145, 1719-1730.
- RAHIB, L., SMITH, B. D., AIZENBERG, R., ROSENZWEIG, A. B., FLESHMAN, J. M. & MATRISIAN, L. M. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*, 74, 2913-21.
- REBOURS, V., BOUTRON-RUAULT, M. C., SCHNEE, M., FEREC, C., MAIRE, F., HAMMEL, P., RUSZNIEWSKI, P. & LEVY, P. 2008. Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. *Am J Gastroenterol*, 103, 111-9.
- RENEHAN, A. G., ZWAHLEN, M. & EGGER, M. 2015. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer*, 15, 484-98.
- RIEDER, H. & BARTSCH, D. K. 2004. Familial pancreatic cancer. *Fam Cancer*, 3, 69-74.
- RIEGERT-JOHNSON, D. L., GLEESON, F. C., ROBERTS, M., THOLEN, K., YOUNGBORG, L., BULLOCK, M. & BOARDMAN, L. A. 2010. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hered Cancer Clin Pract*, 8, 6.
- RING, K. L., BRUEGL, A. S., ALLEN, B. A., ELKIN, E. P., SINGH, N., HARTMAN, A. R., DANIELS, M. S. & BROADDUS, R. R. 2016. Germline multi-gene hereditary cancer panel testing in an unselected endometrial cancer cohort. *Mod Pathol*, 29, 1381-1389.
- ROBERTS, N. J., JIAO, Y., YU, J., KOPELOVICH, L., PETERSEN, G. M., BONDY, M. L., GALLINGER, S., SCHWARTZ, A. G., SYNGAL, S., COTE, M. L., AXILBUND, J., SCHULICK, R., ALI, S. Z., ESHLEMAN, J. R., VELCULESCU, V. E., GOGGINS, M., VOGELSTEIN, B., PAPADOPOULOS, N., HRUBAN, R. H., KINZLER, K. W. & KLEIN, A. P. 2012. ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer. *Cancer Discov*, 2, 41-6.
- ROBERTSON, K. D. & JONES, P. A. 1999. Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. *Oncogene*, 18, 3810-20.
- ROHLIN, A., ZAGORAS, T., NILSSON, S., LUNDSTAM, U., WAHLSTROM, J., HULTEN, L., MARTINSSON, T., KARLSSON, G. B. & NORDLING, M. 2014. A mutation in POLE predisposing to a multi-tumour phenotype. *Int J Oncol*, 45, 77-81.

- ROTHBLUM-OVIATT, C., WRIGHT, J., LEFTON-GREIF, M. A., MCGRATH-MORROW, S. A., CRAWFORD, T. O. & LEDERMAN, H. M. 2016. Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis*, 11, 159.
- RUIJS, M. W., VERHOEF, S., ROOKUS, M. A., PRUNTEL, R., VAN DER HOUT, A. H., HOGERVORST, F. B., KLUIJT, I., SIJMONS, R. H., AALFS, C. M., WAGNER, A., AUSEMS, M. G., HOOGERBRUGGE, N., VAN ASPEREN, C. J., GOMEZ GARCIA, E. B., MEIJERS-HEIJBOER, H., TEN KATE, L. P., MENKO, F. H. & VAN 'T VEER, L. J. 2010. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet*, 47, 421-8.
- RULYAK, S. J., BRETNALL, T. A., LYNCH, H. T. & AUSTIN, M. A. 2003. Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer*, 98, 798-804.
- RUMP, A., BENET-PAGES, A., SCHUBERT, S., KUHLMANN, J. D., JANAVICIUS, R., MACHACKOVA, E., FORETOVA, L., KLEIBL, Z., LHOTA, F., ZEMANKOVA, P., BETCHEVA-KRAJCIR, E., MACKENROTH, L., HACKMANN, K., LEHMANN, J., NISSEN, A., DIDONATO, N., OPITZ, R., THIELE, H., KAST, K., WIMBERGER, P., HOLINSKI-FEDER, E., EMMERT, S., SCHROCK, E. & KLINK, B. 2016. Identification and Functional Testing of ERCC2 Mutations in a Multi-national Cohort of Patients with Familial Breast- and Ovarian Cancer. *PLoS Genet*, 12, e1006248.
- RYAN, N. A. J., MORRIS, J., GREEN, K., LALLOO, F., WOODWARD, E. R., HILL, J., CROSBIE, E. J. & EVANS, D. G. 2017. Association of Mismatch Repair Mutation With Age at Cancer Onset in Lynch Syndrome: Implications for Stratified Surveillance Strategies. *JAMA Oncol*, 3, 1702-1706.
- SAED, L., VARSE, F., BARADARAN, H. R., MORADI, Y., KHATERI, S., FRIBERG, E., KHAZAEI, Z., GHARAHJEH, S., TEHRANI, S., SIOOFY-KHOJINE, A. B. & NAJMI, Z. 2019. The effect of diabetes on the risk of endometrial Cancer: an updated a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 19, 527.
- SALO-MULLEN, E. E., O'REILLY, E. M., KELSEN, D. P., ASHRAF, A. M., LOWERY, M. A., YU, K. H., REIDY, D. L., EPSTEIN, A. S., LINCOLN, A., SALDIA, A., JACOBS, L. M., RAU-MURTHY, R., ZHANG, L., KURTZ, R. C., SALTZ, L., OFFIT, K., ROBSON, M. E. & STADLER, Z. K. 2015. Identification of germline genetic mutations in patients with pancreatic cancer. *Cancer*, 121, 4382-8.
- SETIAWAN, V. W., YANG, H. P., PIKE, M. C., MCCANN, S. E., YU, H., XIANG, Y. B., WOLK, A., WENTZENSEN, N., WEISS, N. S., WEBB, P. M., VAN DEN BRANDT, P. A., VAN DE VIJVER, K., THOMPSON, P. J., AUSTRALIAN NATIONAL ENDOMETRIAL CANCER STUDY, G., STROM, B. L., SPURDLE, A. B., SOSLOW, R. A., SHU, X. O., SCHAIRER, C., SACERDOTE, C., ROHAN, T. E., ROBIEN, K., RISCH, H. A., RICCIERI, F., REBBECK, T. R., RASTOGI, R., PRESCOTT, J., POLIDORO, S., PARK, Y., OLSON, S. H., MOYSICH, K. B., MILLER, A. B., MCCULLOUGH, M. L., MATSUNO, R. K., MAGLIOCCO, A. M., LURIE, G., LU, L., LISSOWSKA, J., LIANG, X., LACEY, J. V., JR., KOLONEL, L. N., HENDERSON, B. E., HANKINSON, S. E., HAKANSSON, N., GOODMAN, M. T., GAUDET, M. M., GARCIA-CLOSAS, M., FRIEDENREICH, C. M., FREUDENHEIM, J. L., DOHERTY, J., DE VIVO, I., COURNEYA, K. S., COOK, L. S., CHEN, C., CERHAN, J. R., CAI, H., BRINTON, L. A., BERNSTEIN, L., ANDERSON, K. E., ANTON-CULVER, H., SCHOUTEN, L. J. & HORN-ROSS, P. L. 2013. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol*, 31, 2607-18.

- SHINDO, K., YU, J., SUENAGA, M., FESHARAKIZADEH, S., CHO, C., MACGREGOR-DAS, A., SIDDIQUI, A., WITMER, P. D., TAMURA, K., SONG, T. J., NAVARRO ALMARIO, J. A., BRANT, A., BORGES, M., FORD, M., BARKLEY, T., HE, J., WEISS, M. J., WOLFGANG, C. L., ROBERTS, N. J., HRUBAN, R. H., KLEIN, A. P. & GOGGINS, M. 2017. Deleterious Germline Mutations in Patients With Apparently Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 35, 3382-3390.
- SHU, C. A., PIKE, M. C., JOTWANI, A. R., FRIEBEL, T. M., SOSLOW, R. A., LEVINE, D. A., NATHANSON, K. L., KONNER, J. A., ARNOLD, A. G., BOGOMOLNIY, F., DAO, F., OLVERA, N., BANCROFT, E. K., GOLDFRANK, D. J., STADLER, Z. K., ROBSON, M. E., BROWN, C. L., LEITAO, M. M., JR., ABU-RUSTUM, N. R., AGHAJANIAN, C. A., BLUM, J. L., NEUHAUSEN, S. L., GARBER, J. E., DALY, M. B., ISAACS, C., EELES, R. A., GANZ, P. A., BARAKAT, R. R., OFFIT, K., DOMCHEK, S. M., REBBECK, T. R. & KAUFF, N. D. 2016. Uterine Cancer After Risk-Reducing Salpingo-oophorectomy Without Hysterectomy in Women With BRCA Mutations. *JAMA Oncol*, 2, 1434-1440.
- SCHARER, O. D. 2013. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a012609.
- SCHNEIDER, R., SLATER, E. P., SINA, M., HABBE, N., FENDRICH, V., MATTHAI, E., LANGER, P. & BARTSCH, D. K. 2011. German national case collection for familial pancreatic cancer (FaPaCa): ten years experience. *Fam Cancer*, 10, 323-30.
- SCHUBERT, S., VAN LUTTIKHUIZEN, J. L., AUBER, B., SCHMIDT, G., HOFMANN, W., PENKERT, J., DAVENPORT, C. F., HILLE-BETZ, U., WENDEBURG, L., BUBLITZ, J., TAUSCHER, M., HACKMANN, K., SCHROCK, E., SCHOLZ, C., WALLASCHEK, H., SCHLEGELBERGER, B., ILLIG, T. & STEINEMANN, D. 2019. The identification of pathogenic variants in BRCA1/2 negative, high risk, hereditary breast and/or ovarian cancer patients: High frequency of FANCM pathogenic variants. *Int J Cancer*, 144, 2683-2694.
- SINGH, A. P., CHAUHAN, S. C., ANDRIANIFAHANANA, M., MONIAUX, N., MEZA, J. L., COPIN, M. C., VAN SEUNINGEN, I., HOLLINGSWORTH, M. A., AUBERT, J. P. & BATRA, S. K. 2007. MUC4 expression is regulated by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreatic adenocarcinoma cells via transcriptional and post-translational mechanisms. *Oncogene*, 26, 30-41.
- SLATER, E. P., LANGER, P., NIEMCZYK, E., STRAUCH, K., BUTLER, J., HABBE, N., NEOPTOLEMOS, J. P., GREENHALF, W. & BARTSCH, D. K. 2010. PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet*, 78, 490-4.
- SMITH, A. L., ALIREZAIE, N., CONNOR, A., CHAN-SENG-YUE, M., GRANT, R., SELANDER, I., BASCUNANA, C., BORGIDA, A., HALL, A., WHELAN, T., HOLTER, S., MCPHERSON, T., CLEARLY, S., PETERSEN, G. M., OMEROGU, A., SALOUSTROS, E., MCPHERSON, J., STEIN, L. D., FOULKES, W. D., MAJEWSKI, J., GALLINGER, S. & ZOGOPOULOS, G. 2016. Candidate DNA repair susceptibility genes identified by exome sequencing in high-risk pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 370, 302-12.
- SOUKUPOVA, J., ZEMANKOVA, P., LHOTOVA, K., JANATOVA, M., BORECKA, M., STOLAROVA, L., LHOTA, F., FORETOVA, L., MACHACKOVA, E., STRANECKY, V., TAVANDZIS, S., KLEIBLOVA, P., VOCKA, M., HARTMANNOVA, H., HODANOVA, K., KMOCH, S. & KLEIBL, Z. 2018. Validation of CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One*, 13, e0195761.

- SPIER, I., HOLZAPFEL, S., ALTMULLER, J., ZHAO, B., HORPAOPAN, S., VOGT, S., CHEN, S., MORAK, M., RAEDER, S., KAYSER, K., STIENEN, D., ADAM, R., NURNBERG, P., PLOTZ, G., HOLINSKI-FEDER, E., LIFTON, R. P., THIELE, H., HOFFMANN, P., STEINKE, V. & ARETZ, S. 2015. Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer*, 137, 320-31.
- SPURDLE, A. B., BOWMAN, M. A., SHAMSANI, J. & KIRK, J. 2017. Endometrial cancer gene panels: clinical diagnostic vs research germline DNA testing. *Mod Pathol*, 30, 1048-1068.
- STADLER, Z. K., SALO-MULLEN, E., SABBAGHIAN, N., SIMON, J. A., ZHANG, L., OLSON, S. H., KURTZ, R., OFFIT, K., FOULKES, W. D., ROBSON, M. E. & TISCHKOWITZ, M. 2011. Germline PALB2 mutation analysis in breast-pancreas cancer families. *J Med Genet*, 48, 523-5.
- STENMAN, U. H., KOIVUNEN, E. & ITKONEN, O. 1991. Biology and function of tumor-associated trypsin inhibitor, TATI. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 207, 5-9.
- STOLAROVA, L., JELINKOVA, S., STORCHOVA, R., MACHACKOVA, E., ZEMANKOVA, P., VOCKA, M., KODET, O., KRAL, J., CERNA, M., VOLKOVA, Z., JANATOVA, M., SOUKUPOVA, J., STRANECKY, V., DUNDR, P., FORETOVA, L., MACUREK, L., KLEIBLOVA, P. & KLEIBL, Z. 2020a. Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes. *Biomedicines*, 8, 404.
- STOLAROVA, L., KLEIBLOVA, P., JANATOVA, M., SOUKUPOVA, J., ZEMANKOVA, P., MACUREK, L. & KLEIBL, Z. 2020b. CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells*, 9, 2675.
- SVILAR, D., GOELLNER, E. M., ALMEIDA, K. H. & SOBOL, R. W. 2011. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal*, 14, 2491-507.
- SY, S. M., HUEN, M. S. & CHEN, J. 2009. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 7155-60.
- TAFE, L. J., RIGGS, E. R. & TSONGALIS, G. J. 2014. Lynch syndrome presenting as endometrial cancer. *Clin Chem*, 60, 111-21.
- TAMURA, K., YU, J., HATA, T., SUENAGA, M., SHINDO, K., ABE, T., MACGREGOR-DAS, A., BORGES, M., WOLFGANG, C. L., WEISS, M. J., HE, J., CANTO, M. I., PETERSEN, G. M., GALLINGER, S., SYNGAL, S., BRAND, R. E., RUSTGI, A., OLSON, S. H., STOFFEL, E., COTE, M. L., ZOGOPOULOS, G., POTASH, J. B., GOES, F. S., MCCOMBIE, R. W., ZANDI, P. P., PIROOZANIA, M., KRAMER, M., PARLA, J., ESHLEMAN, J. R., ROBERTS, N. J., HRUBAN, R. H., KLEIN, A. P. & GOGGINS, M. 2018. Mutations in the pancreatic secretory enzymes CPA1 and CPB1 are associated with pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 4767-4772.
- TAN, M. H., MESTER, J. L., NGEOW, J., RYBICKI, L. A., ORLOFF, M. S. & ENG, C. 2012. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res*, 18, 400-7.
- TANAKA, M. 2014. Thirty years of experience with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: from discovery to international consensus. *Digestion*, 90, 265-72.
- TEICH, N., LE MARECHAL, C., KUKOR, Z., CACA, K., WITZIGMANN, H., CHEN, J. M., TOTTH, M., MOSSNER, J., KEIM, V., FEREC, C. & SAHIN-TOTTH, M. 2004.

- Interaction between trypsinogen isoforms in genetically determined pancreatitis: mutation E79K in cationic trypsin (PRSS1) causes increased transactivation of anionic trypsinogen (PRSS2). *Hum Mutat*, 23, 22-31.
- THOMPSON, D., EASTON, D. F. & BREAST CANCER LINKAGE, C. 2002. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 94, 1358-65.
- TIAN, W., BI, R., REN, Y., HE, H., SHI, S., SHAN, B., YANG, W., WANG, Q. & WANG, H. 2019. Screening for hereditary cancers in patients with endometrial cancer reveals a high frequency of germline mutations in cancer predisposition genes. *Int J Cancer*, 145, 1290-1298.
- TISCHKOWITZ, M. D., SABBAGHIAN, N., HAMEL, N., BORGIDA, A., ROSNER, C., TAHERIAN, N., SRIVASTAVA, A., HOLTER, S., ROTHENMUND, H., GHADIRIAN, P., FOULKES, W. D. & GALLINGER, S. 2009. Analysis of the gene coding for the BRCA2-interacting protein PALB2 in familial and sporadic pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 137, 1183-6.
- TORRY, D. S. & COOPER, G. M. 1991. Proto-oncogenes in development and cancer. *Am J Reprod Immunol*, 25, 129-32.
- TOVAR, E. A. & GRAVEEL, C. R. 2017. MET in human cancer: germline and somatic mutations. *Ann Transl Med*, 5, 205.
- TURATI, F., EDEFONTI, V., BOSETTI, C., FERRARONI, M., MALVEZZI, M., FRANCESCHI, S., TALAMINI, R., MONTELLA, M., LEVI, F., DAL MASO, L., SERRAINO, D., POLESEL, J., NEGRI, E., DECARLI, A. & LA VECCHIA, C. 2013. Family history of cancer and the risk of cancer: a network of case-control studies. *Ann Oncol*, 24, 2651-2656.
- VALLE, L., HERNANDEZ-ILLAN, E., BELLIDO, F., AIZA, G., CASTILLEJO, A., CASTILLEJO, M. I., NAVARRO, M., SEGUI, N., VARGAS, G., GUARINOS, C., JUAREZ, M., SANJUAN, X., IGLESIAS, S., ALENDA, C., EGOAVIL, C., SEGURA, A., JUAN, M. J., RODRIGUEZ-SOLER, M., BRUNET, J., GONZALEZ, S., JOVER, R., LAZARO, C., CAPELLA, G., PINEDA, M., SOTO, J. L. & BLANCO, I. 2014. New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis. *Hum Mol Genet*, 23, 3506-12.
- VAN DER HEIJDEN, M. S., YEO, C. J., HRUBAN, R. H. & KERN, S. E. 2003. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res*, 63, 2585-8.
- VASEN, H. F., GRUIS, N. A., FRANTS, R. R., VAN DER VELDEN, P. A., HILLE, E. T. & BERGMAN, W. 2000. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer*, 87, 809-11.
- VIETRI, M. T., D'ELIA, G., CALIENDO, G., CASAMASSIMI, A., FEDERICO, A., PASSARIELLO, L., CIOFFI, M. & MOLINARI, A. M. 2021. Prevalence of mutations in BRCA and MMR genes in patients affected with hereditary endometrial cancer. *Med Oncol*, 38, 13.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 2015. The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out. *N Engl J Med*, 373, 1895-8.
- WAIN, K. E., ELLINGSON, M. S., MCDONALD, J., GAMMON, A., ROBERTS, M., PICHURIN, P., WINSHIP, I., RIEGERT-JOHNSON, D. L., WEITZEL, J. N. & LINDOR, N. M. 2014. Appreciating the broad clinical features of SMAD4 mutation carriers: a multicenter chart review. *Genet Med*, 16, 588-93.
- WESTIN, S. N., LACOUR, R. A., URBAUER, D. L., LUTHRA, R., BODURKA, D. C., LU, K. H. & BROADDUS, R. R. 2008. Carcinoma of the lower uterine segment: a newly described association with Lynch syndrome. *J Clin Oncol*, 26, 5965-71.

- WHITCOMB, D. C., GORRY, M. C., PRESTON, R. A., FUREY, W., SOSENHEIMER, M. J., ULRICH, C. D., MARTIN, S. P., GATES, L. K., JR., AMANN, S. T., TOSKES, P. P., LIDDLE, R., MCGRATH, K., UOMO, G., POST, J. C. & EHRLICH, G. D. 1996. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*, 14, 141-5.
- WIEME, G., KRAL, J., ROSSEEL, T., ZEMANKOVA, P., PARTON, B., VOCKA, M., VAN HEETVELDE, M., KLEIBLOVA, P., BLAUMEISER, B., SOUKUPOVA, J., VAN DEN ENDE, J., NEHASIL, P., TEJPAR, S., BORECKA, M., GOMEZ GARCIA, E. B., BLOK, M. J., SAFARIKOVA, M., KALOUSOVA, M., GEBOES, K., DE PUTTER, R., POPPE, B., DE LEENEER, K., KLEIBL, Z., JANATOVA, M. & CLAES, K. B. M. 2021. Prevalence of Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposing Genes in Czech and Belgian Pancreatic Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, 13, 4430.
- WIN, A. K., CLEARY, S. P., DOWTY, J. G., BARON, J. A., YOUNG, J. P., BUCHANAN, D. D., SOUTHEY, M. C., BURNETT, T., PARFREY, P. S., GREEN, R. C., LE MARCHAND, L., NEWCOMB, P. A., HAILE, R. W., LINDOR, N. M., HOPPER, J. L., GALLINGER, S. & JENKINS, M. A. 2011. Cancer risks for monoallelic MUTYH mutation carriers with a family history of colorectal cancer. *Int J Cancer*, 129, 2256-62.
- WIN, A. K., DOWTY, J. G., CLEARY, S. P., KIM, H., BUCHANAN, D. D., YOUNG, J. P., CLENDENNING, M., ROSTY, C., MACINNIS, R. J., GILES, G. G., BOUSSIOUTAS, A., MACRAE, F. A., PARRY, S., GOLDBLATT, J., BARON, J. A., BURNETT, T., LE MARCHAND, L., NEWCOMB, P. A., HAILE, R. W., HOPPER, J. L., COTTERCHIO, M., GALLINGER, S., LINDOR, N. M., TUCKER, K. M., WINSHIP, I. M. & JENKINS, M. A. 2014. Risk of colorectal cancer for carriers of mutations in MUTYH, with and without a family history of cancer. *Gastroenterology*, 146, 1208-11 e1-5.
- WITT, H., BEER, S., ROSENDAHL, J., CHEN, J. M., CHANDAK, G. R., MASAMUNE, A., BENICE, M., SZMOLA, R., ORACZ, G., MACEK, M., JR., BHATIA, E., STEIGENBERGER, S., LASHER, D., BUHLER, F., DELAPORTE, C., TEBBING, J., LUDWIG, M., PILSAK, C., SAUM, K., BUGERT, P., MASSON, E., PALIWAL, S., BHASKAR, S., SOBCZYNSKA-TOMASZEWSKA, A., BAK, D., BALASCAK, I., CHOUDHURI, G., NAGESHWAR REDDY, D., RAO, G. V., THOMAS, V., KUME, K., NAKANO, E., KAKUTA, Y., SHIMOSEGAWA, T., DURKO, L., SZABO, A., SCHNUR, A., HEGYI, P., RAKONCZAY, Z., JR., PFUTZER, R., SCHNEIDER, A., GRONEBERG, D. A., BRAUN, M., SCHMIDT, H., WITT, U., FRIESS, H., ALGUL, H., LANDT, O., SCHUELKE, M., KRUGER, R., WIEDENMANN, B., SCHMIDT, F., ZIMMER, K. P., KOVACS, P., STUMVOLL, M., BLUHER, M., MULLER, T., JANECKE, A., TEICH, N., GRUTZMANN, R., SCHULZ, H. U., MOSSNER, J., KEIM, V., LOHR, M., FEREC, C. & SAHIN-TOTH, M. 2013. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet*, 45, 1216-20.
- WRIGHT, W. D., SHAH, S. S. & HEYER, W. D. 2018. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 293, 10524-10535.
- WU-BAER, F., LAGRAZON, K., YUAN, W. & BAER, R. 2003. The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem*, 278, 34743-6.
- YABAR, C. S. & WINTER, J. M. 2016. Pancreatic Cancer: A Review. *Gastroenterol Clin North Am*, 45, 429-45.

- YADAV, S., KASI, P. M., BAMLET, W. R., HO, T. P., POLLEY, E. C., HU, C., HART, S. N., RABE, K. G., BODDICKER, N. J., GNANAOLIVU, R. D., LEE, K. Y., LINDSTROM, T. H., PETERSEN, G. M., COUCH, F. J. & MCWILLIAMS, R. R. 2020. Effect of Germline Mutations in Homologous Recombination Repair Genes on Overall Survival of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 26, 6505-6512.
- YACHIDA, S., JONES, S., BOZIC, I., ANTAL, T., LEARY, R., FU, B., KAMIYAMA, M., HRUBAN, R. H., ESHLEMAN, J. R., NOWAK, M. A., VELCULESCU, V. E., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. 2010. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467, 1114-7.
- YANG, X., LESLIE, G., DOROSZUK, A., SCHNEIDER, S., ALLEN, J., DECKER, B., DUNNING, A. M., REDMAN, J., SCARTH, J., PLASKOCINSKA, I., LUCCARINI, C., SHAH, M., POOLEY, K., DORLING, L., LEE, A., ADANK, M. A., ADLARD, J., AITOMAKI, K., ANDRULIS, I. L., ANG, P., BARWELL, J., BERNSTEIN, J. L., BOBOLIS, K., BORG, A., BLOMQVIST, C., CLAES, K. B. M., CONCANNON, P., CUGGIA, A., CULVER, J. O., DAMIOLA, F., DE PAUW, A., DIEZ, O., DOLINSKY, J. S., DOMCHEK, S. M., ENGEL, C., EVANS, D. G., FOSTIRA, F., GARBER, J., GOLMARD, L., GOODE, E. L., GRUBER, S. B., HAHNEN, E., HAKE, C., HEIKKINEN, T., HURLEY, J. E., JANAVICIUS, R., KLEIBL, Z., KLEIBLOVA, P., KONSTANTOPOULOU, I., KVIST, A., LADUCA, H., LEE, A. S. G., LESUEUR, F., MAHER, E. R., MANNERMAA, A., MANOUKIAN, S., MCFARLAND, R., MCKINNON, W., MEINDL, A., METCALFE, K., MOHD TAIB, N. A., MOILANEN, J., NATHANSON, K. L., NEUHAUSEN, S., NG, P. S., NGUYEN-DUMONT, T., NIELSEN, S. M., OBERMAIR, F., OFFIT, K., OLOPADE, O. I., OTTINI, L., PENKERT, J., PYLKAS, K., RADICE, P., RAMUS, S. J., RUDAITIS, V., SIDE, L., SILVA-SMITH, R., SILVESTRI, V., SKYTTE, A. B., SLAVIN, T., SOUKUPOVA, J., TONDINI, C., TRAINER, A. H., UNZEITIG, G., USHA, L., VAN OVEREEM HANSEN, T., WHITWORTH, J., WOOD, M., YIP, C. H., YOON, S. Y., YUSSUF, A., ZOGOPOULOS, G., GOLDFAR, D., HOPPER, J. L., CHENEVIX-TRENCH, G., PHAROAH, P., GEORGE, S. H. L., BALMANA, J., HOUDAYER, C., et al. 2020. Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol*, 38, 674-685.
- YEN, T. T., WANG, T. L., FADER, A. N., SHIH, I. M. & GAILLARD, S. 2020. Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Pathol*, 39, 26-35.
- YURGELUN, M. B., CHITTENDEN, A. B., MORALES-OYARVIDE, V., RUBINSON, D. A., DUNNE, R. F., KOZAK, M. M., QIAN, Z. R., WELCH, M. W., BRAIS, L. K., DA SILVA, A., BUI, J. L., YUAN, C., LI, T., LI, W., MASUDA, A., GU, M., BULLOCK, A. J., CHANG, D. T., CLANCY, T. E., LINEHAN, D. C., FINDEIS-HOSEY, J. J., DOYLE, L. A., THORNER, A. R., DUCAR, M. D., WOLLISON, B. M., KHALAF, N., PEREZ, K., SYNGAL, S., AGUIRRE, A. J., HAHN, W. C., MEYERSON, M. L., FUCHS, C. S., OGINO, S., HORNICK, J. L., HEZEL, A. F., KOONG, A. C., NOWAK, J. A. & WOLPIN, B. M. 2019. Germline cancer susceptibility gene variants, somatic second hits, and survival outcomes in patients with resected pancreatic cancer. *Genet Med*, 21, 213-223.
- ZEQIRAJ, E., FILIPPI, B. M., DEAK, M., ALESSI, D. R. & VAN AALTEN, D. M. 2009. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science*, 326, 1707-11.

- ZHAN, W., SHELTON, C. A., GREER, P. J., BRAND, R. E. & WHITCOMB, D. C. 2018. Germline Variants and Risk for Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Emerging Concepts. *Pancreas*, 47, 924-936.
- ZHANG, Z. H., SU, P. Y., HAO, J. H. & SUN, Y. H. 2013. The role of preexisting diabetes mellitus on incidence and mortality of endometrial cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Gynecol Cancer*, 23, 294-303.
- ZHAO, S., CHEN, L., ZANG, Y., LIU, W., LIU, S., TENG, F., XUE, F. & WANG, Y. 2022. Endometrial cancer in Lynch syndrome. *Int J Cancer*, 150, 7-17.

Přílohy

Příloha 1. Seznam všech 226 genů panelu CZECANCA včetně čísel jejich transkriptů a plných názvů.

m J é no genu	l Čís o transkriptu	Plné jméno genu (alternativní názvy)
<i>AIP</i>	NM_003977.3	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein
<i>ALK</i>	NM_004304.4	Anaplastic lymphoma kinase
<i>APC</i>	NM_000038.5	Adenomatous polyposis coli
<i>APEX1</i>	NM_001641.3	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
<i>ATM</i>	NM_000051.3	Ataxia telangiectasia mutated
<i>ATMIN</i>	NM_015251.2	ATM interactor
<i>ATR</i>	NM_001184.3	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
<i>ATRIP</i>	NM_130384.2	ATR interacting protein
<i>AURKA</i>	NM_198433.2	Aurora kinase A
<i>AXIN1</i>	NM_003502.3	Axin 1
<i>BABAMI</i>	NM_001033549.2	BRISC and BRCA1 A complex member 1
<i>BAP1</i>	NM_004656.3	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)
<i>BARD1</i>	NM_000465.3	BRCA1 associated RING domain 1
<i>BLM</i>	NM_000057.3	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
<i>BMPRIA</i>	NM_004329.2	Bone morphogenetic protein receptor, type IA
<i>BRAP</i>	NM_006768.4	BRCA1 associated protein
<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	Breast cancer 1, early onset
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	Breast cancer 2, early onset
<i>BRCC3</i>	NM_024332.3	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3
<i>BRE</i>	NM_004899.4	Brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)
<i>BRIP1</i>	NM_032043.2	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
<i>BUB1B</i>	NM_001211.5	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta
<i>CASP8</i>	NM_001080125.1	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
<i>CCND1</i>	NM_053056.2	Cyclin D1
<i>CDC73</i>	NM_024529.4	Cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog
<i>CDH1</i>	NM_004360.4	Cadherin 1, type 1, E-cadherin
<i>CDK4</i>	NM_000075.3	Cyclin-dependent kinase 4

<i>CDKN1B</i>	NM_004064.4	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
<i>CDKN1C</i>	NM_000076.2	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
<i>CDKN2A</i>	NM_000077.4	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>CEBPA</i>	NM_004364.4	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
<i>CEP57</i>	NM_014679.4	Centrosomal protein 57kDa
<i>CLSPN</i>	NM_022111.3	Claspin
<i>CSNK1D</i>	NM_001893.4	Casein kinase 1, delta
<i>CSNK1E</i>	NM_001894.4	Casein kinase 1, epsilon
<i>CWF19L2</i>	NM_152434.2	CWF19-like 2, cell cycle control
<i>CYLD</i>	NM_015247.2	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)
<i>DCLRE1C</i>	NM_001033855.2	DNA cross-link repair 1C
<i>DDB2</i>	NM_000107.2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa
<i>DHFR</i>	NM_000791.3	Dihydrofolate reductase
<i>DICER1</i>	NM_030621.4	Dicer 1, ribonuclease type III
<i>DIS3L2</i>	NM_152383.4	DIS3 like 3'-5' exoribonuclease 2
<i>DMBT1</i>	NM_007329.2	Deleted in malignant brain tumors 1
<i>DMC1</i>	NM_007068.3	DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination
<i>DNAJC21</i>	NM_194283.3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 21
<i>DPYD</i>	NM_000110.3	Dihydropyrimidine dehydrogenase
<i>EGFR</i>	NM_005228.3	Epidermal growth factor receptor
<i>EMSY</i>	NM_001300942.1	EMSY transcriptional repressor, BRCA2 interacting
<i>EPCAM*</i>	NM_002354.2	Epithelial cell adhesion molecule
<i>EPHX1</i>	NM_000120.3	Epoxide hydrolase 1
<i>ERCC1</i>	NM_001983.3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
<i>ERCC2</i>	NM_000400.3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
<i>ERCC3</i>	NM_000122.1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3
<i>ERCC4</i>	NM_005236.2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4

<i>ERCC5</i>	NM_000123.3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5
<i>ERCC6</i>	NM_000124.3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6
<i>ESR1</i>	NM_000125.3	Estrogen receptor 1
<i>ESR2</i>	NM_001437.2	Estrogen receptor 2 (ER beta)
<i>EXO1</i>	NM_006027.4	Exonuclease 1
<i>EXT1</i>	NM_000127.2	Exostosin 1
<i>EXT2</i>	NM_000401.3	Exostosin 2
<i>EYA2</i>	NM_005244.4	Eyes absent homolog 2
<i>EZH2</i>	NM_004456.4	Enhancer of zeste homolog 2
<i>FAAP24</i>	NM_152266.4	FA core complex associated protein 24
<i>FAM175A</i>	NM_139076.2	Family with sequence similarity 175, member A
<i>FAM175B</i>	NM_032182.3	Family with sequence similarity 175, member B
<i>FANI</i>	NM_014967.4	FANCD2/FANCI-associated nuclease 1
<i>FANCA</i>	NM_000135.2	Fanconi anemia, complementation group A
<i>FANCB</i>	NM_001018113.2	Fanconi anemia, complementation group B
<i>FANCC</i>	NM_000136.2	Fanconi anemia, complementation group C
<i>FANCD2</i>	NM_033084.4	Fanconi anemia, complementation group D2
<i>FANCE</i>	NM_021922.2	Fanconi anemia, complementation group E
<i>FANCF</i>	NM_022725.3	Fanconi anemia, complementation group F
<i>FANCG</i>	NM_004629.1	Fanconi anemia, complementation group G
<i>FANCI</i>	NM_001113378.1	Fanconi anemia, complementation group I
<i>FANCL</i>	NM_001114636.1	Fanconi anemia, complementation group L
<i>FANCM</i>	NM_020937.3	Fanconi anemia, complementation group M
<i>FBXW7</i>	NM_033632.3	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase
<i>FH</i>	NM_000143.3	Fumarate hydratase
<i>FLCN</i>	NM_144997.5	Folliculin

<i>GADD45A</i>	NM_001924.3	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
<i>GATA2</i>	NM_001145661.1	GATA binding protein 2
<i>GPC3</i>	NM_004484.3	Glypican 3
<i>GRB7</i>	NM_001242442.1	Growth factor receptor-bound protein 7
<i>HELQ</i>	NM_133636.3	Helicase, POLQ-like
<i>HNF1A</i>	NM_001306179.1	HNF1 homeobox A
<i>HOXB13</i>	NM_006361.5	Homeobox B13
<i>HRAS</i>	NM_005343.3	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>HUS1</i>	NM_004507.3	HUS1 checkpoint homolog
<i>CHEK1</i>	NM_001114122.2	Checkpoint kinase 1
<i>CHEK2</i>	NM_007194.3	Checkpoint kinase 2
<i>KAT5</i>	NM_182710.2	K(lysine) acetyltransferase 5
<i>KCNJ5</i>	NM_000890.3	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5
<i>KIT</i>	NM_000222.2	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
<i>LIG1</i>	NM_000234.2	Ligase I, DNA, ATP-dependent
<i>LIG3</i>	NM_013975.3	Ligase III, DNA, ATP-dependent
<i>LIG4</i>	NM_002312.3	Ligase IV, DNA, ATP-dependent
<i>LMO1</i>	NM_002315.2	LIM domain only 1
<i>LRIG1</i>	NM_015541.2	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
<i>MAX</i>	NM_002382.4	MYC associated factor X
<i>MCPHI</i>	NM_024596.4	Microcephalin 1
<i>MDC1</i>	NM_014641.2	Mediator of DNA-damage checkpoint 1
<i>MDM2</i>	NM_002392.5	Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog
<i>MDM4</i>	NM_002393.4	Mdm4 p53 binding protein homolog
<i>MEN1</i>	NM_000244.3	Multiple endocrine neoplasia I
<i>MET</i>	NM_001127500.2	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
<i>MGMT</i>	NM_002412.4	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
<i>MLH1</i>	NM_000249.3	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2
<i>MLH3</i>	NM_001040108.1	mutL homolog 3
<i>MMP8</i>	NM_002424.2	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
<i>MPL</i>	NM_005373.2	Myeloproliferative leukemia virus oncogene
<i>MRE11</i>	NM_005591.3	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A

<i>MSH2</i>	NM_000251.2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1
<i>MSH3</i>	NM_002439.4	mutS homolog 3
<i>MSH5</i>	NM_002441.4	mutS homolog 5
<i>MSH6</i>	NM_000179.2	mutS homolog 6
<i>MSR1</i>	NM_138715.2	Macrophage scavenger receptor 1
<i>MUS81</i>	NM_025128.4	MUS81 endonuclease homolog
<i>MUTYH</i>	NM_001128425.1	mutY homolog
<i>NAT1</i>	NM_000662.7	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)
<i>NBN</i>	NM_002485.4	Nibrin
<i>NCAMI</i>	NM_001242607.1	Neural cell adhesion molecule 1
<i>NELFB</i>	NM_015456.4	Cofactor of BRCA1
<i>NF1</i>	NM_000267.3	Neurofibromin 1
<i>NF2</i>	NM_000268.3	Neurofibromin 2 (merlin)
<i>NFKBIZ</i>	NM_031419.3	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
<i>NHEJ1</i>	NM_024782.2	Nonhomologous end-joining factor 1
<i>NSD1</i>	NM_022455.4	Nuclear receptor binding SET domain protein 1
<i>OGG1</i>	NM_002542.5	8-oxoguanine DNA glycosylase
<i>PALB2</i>	NM_024675.3	Partner and localizer of BRCA2
<i>PARP1</i>	NM_001618.3	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
<i>PCNA</i>	NM_002592.2	Proliferating cell nuclear antigen
<i>PHB</i>	NM_002634.3	Prohibitin
<i>PHOX2B</i>	NM_003924.3	Paired-like homeobox 2b
<i>PIK3CG</i>	NM_002649.3	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma
<i>PLA2G2A</i>	NM_000300.3	Phospholipase A2, group IIA
<i>PMS1</i>	NM_000534.4	PMS1 postmeiotic segregation increased 1
<i>PMS2</i>	NM_000535.6	PMS1 homolog 2
<i>POLB</i>	NM_002690.2	Polymerase (DNA directed), beta
<i>POLD1</i>	NM_002691.3	Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit
<i>POLE</i>	NM_006231.3	Polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit
<i>PPM1D</i>	NM_003620.3	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D
<i>PREX2</i>	NM_024870.3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2
<i>PRF1</i>	NM_001083116.1	Perforin 1 (pore forming protein)
<i>PRKARIA</i>	NM_212471.2	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha

<i>PRKDC</i>	NM_006904.6	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
<i>PTEN</i>	NM_000314.6	Phosphatase and tensin homolog
<i>PTCH1</i>	NM_000264.3	Patched 1
<i>PTTG2</i>	NM_006607.2	Pituitary tumor-transforming 2
<i>RAD1</i>	NM_002853.3	RAD1 homolog
<i>RAD17</i>	NM_133338.2	RAD17 homolog
<i>RAD18</i>	NM_020165.3	RAD18 homolog
<i>RAD23B</i>	NM_002874.4	RAD23 homolog B
<i>RAD50</i>	NM_005732.3	RAD50 homolog
<i>RAD51</i>	NM_133487.3	RAD51 homolog
<i>RAD51AP1</i>	NM_001130862.1	RAD51 associated protein 1
<i>RAD51B</i>	NM_133509.3	RAD51 homolog B
<i>RAD51C</i>	NM_058216.2	RAD51 homolog C
<i>RAD51D</i>	NM_002878.3	RAD51 homolog D
<i>RAD52</i>	NM_134424.3	RAD52 homolog
<i>RAD54B</i>	NM_012415.3	RAD54 homolog B
<i>RAD54L</i>	NM_003579.3	RAD54-like
<i>RAD9A</i>	NM_004584.2	RAD9 homolog A
<i>RBI</i>	NM_000321.2	Retinoblastoma 1
<i>RBBP8</i>	NM_002894.2	Retinoblastoma binding protein 8
<i>RECQL</i>	NM_002907.3	RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)
<i>RECQL4</i>	NM_004260.3	RecQ protein-like 4
<i>RECQL5</i>	NM_004259.6	RecQ protein-like 5
<i>RET</i>	NM_020975.4	Ret proto-oncogene
<i>RFC1</i>	NM_002913.4	Replication factor C (activator 1) 1, 145kDa
<i>RFC2</i>	NM_181471.2	Replication factor C (activator 1) 2, 40kDa
<i>RFC4</i>	NM_181573.2	Replication factor C (activator 1) 4, 37kDa
<i>RHBDF2</i>	NM_024599.5	Rhomoid 5 homolog 2
<i>RNF146</i>	NM_001242844.1	Ring finger protein 146
<i>RNF168</i>	NM_152617.3	Ring finger protein 168, E3 ubiquitin protein ligase
<i>RNF8</i>	NM_003958.3	Ring finger protein 8, E3 ubiquitin protein ligase
<i>RPA1</i>	NM_002945.3	Replication protein A1, 70kDa
<i>RUNX1</i>	NM_001754.4	Runt-related transcription factor 1
<i>SBDS</i>	NM_016038.2	SBDS ribosome maturation factor
<i>SDHA</i>	NM_004168.3	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
<i>SDHAF2</i>	NM_017841.2	Succinate dehydrogenase complex assembly factor 2

<i>SDHB</i>	NM_003000.2	Succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)
<i>SDHC</i>	NM_003001.3	Succinate dehydrogenase complex subunit C
<i>SDHD</i>	NM_003002.3	Succinate dehydrogenase complex subunit D
<i>SETBP1</i>	NM_002894.2	SET binding protein 1
<i>SETX</i>	NM_015046.5	Senataxin
<i>SHPRH</i>	NM_001042683.2	SNF2 histone linker PHD RING helicase, E3 ubiquitin protein ligase
<i>SLX4</i>	NM_032444.2	SLX4 structure-specific endonuclease subunit homolog
<i>SMAD4</i>	NM_005359.5	SMAD family member 4
<i>SMARCA4</i>	NM_001128849.1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
<i>SMARCB1</i>	NM_003073.4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
<i>SMARCE1</i>	NM_003079.4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1
<i>STK11</i>	NM_000455.4	Serine/threonine kinase 11
<i>SUFU</i>	NM_016169.3	Suppressor of fused homolog
<i>TCL1A</i>	NM_021966.2	T-cell leukemia/lymphoma 1A
<i>TELO2</i>	NM_016111.3	TEL2, telomere maintenance 2, homolog
<i>TERF2</i>	NM_005652.4	Telomeric repeat binding factor 2
<i>TERT</i>	NM_198253.2	Telomerase reverse transcriptase
<i>TLR2</i>	NM_003264.4	Toll-like receptor 2
<i>TLR4</i>	NM_138554.4	Toll-like receptor 4
<i>TMEM127</i>	NM_017849.3	Transmembrane protein 127
<i>TOPBP1</i>	NM_007027.3	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1
<i>TP53</i>	NM_000546.5	Tumor protein p53
<i>TP53BP1</i>	NM_133487.3	Tumor protein p53 binding protein 1
<i>TSC1</i>	NM_000368.4	Tuberous sclerosis 1
<i>TSC2</i>	NM_000548.4	Tuberous sclerosis 2
<i>TSHR</i>	NM_000369.2	Thyroid stimulating hormone receptor
<i>UBE2A</i>	NM_003336.3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2A
<i>UBE2B</i>	NM_003337.3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2B
<i>UBE2I</i>	NM_003345	Ubiquitin-conjugating enzyme E2I
<i>UBE2V2</i>	NM_003350.2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
<i>UBE4B</i>	NM_001105562.2	Ubiquitination factor E4B
<i>UIMC1</i>	NM_001199297.2	Ubiquitin interaction motif containing 1

<i>VHL</i>	NM_000551.3	Von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase
<i>WRN</i>	NM_000553.4	Werner syndrome, RecQ helicase-like
<i>WT1</i>	NM_024426.4	Wilms tumor 1
<i>XPA</i>	NM_000380.3	Xeroderma pigmentosum, complementation group A
<i>XPC</i>	NM_004628.4	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
<i>XRCC1</i>	NM_006297.2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
<i>XRCC2</i>	NM_005431.1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
<i>XRCC3</i>	NM_005432.3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3
<i>XRCC4</i>	NM_022406.3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
<i>XRCC5</i>	NM_021141.3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5
<i>XRCC6</i>	NM_001469.4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
<i>ZNF350</i>	NM_021632.3	Zinc finger protein 350
<i>ZNF365</i>	NM_014951.2	Zinc finger protein 365

*Pouze delece 3' konce inaktivující gen *MSH2*

Příloha 2:

Wieme G, Kral J, Rosseel T, Zemankova P, Parton B, Vocka M, Van Heetvelde M, Kleiblova P, Blaumeiser B, Soukupova J, van den Ende J, Nehasil P, Tejpar S, Borecka M, Gómez García EB, Blok MJ, Safarikova M, Kalousova M, Geboes K, De Putter R, Poppe B, De Leeneer K, Kleibl Z, Janatova M, Claes KBM. **Prevalence of Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposing Genes in Czech and Belgian Pancreatic Cancer Patients.** *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 2;13(17):4430. doi: 10.3390/cancers13174430. PMID: 34503238; PMCID: PMC8431631.

Article

Prevalence of Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposing Genes in Czech and Belgian Pancreatic Cancer Patients

Greet Wieme ^{1,2,†} , Jan Kral ^{3,†} , Toon Rosseel ¹ , Petra Zemankova ³ , Bram Parton ^{1,2} , Michal Vocka ⁴ ,
Mattias Van Heetvelde ^{1,2} , Petra Kleiblova ⁵ , Bettina Blaumeiser ⁶ , Jana Soukupova ^{3,5} ,
Jenneke van den Ende ⁶ , Petr Nehasil ^{3,5,7} , Sabine Tejpar ⁸ , Marianna Borecka ^{3,5} , Encarna B. Gómez García ^{9,10} ,
Marinus J. Blok ^{9,10} , Marketa Safarikova ¹¹ , Marta Kalousova ¹¹ , Karen Geboes ^{2,12} , Robin De Putter ^{1,2} ,
Bruce Poppe ^{1,2} , Kim De Leeneer ^{1,2} , Zdenek Kleibl ³ , Marketa Janatova ^{3,5,*}  and Kathleen B. M. Claes ^{1,2,*} 

- ¹ Center for Medical Genetics, Ghent University and Ghent University Hospital, 9000 Ghent, Belgium; Greet.Wieme@UGent.be (G.W.); Toon.Rosseel@UGent.be (T.R.); Bram.Parton@UGent.be (B.P.); Mattias.VanHeetvelde@UGent.be (M.V.H.); Robin.dePutter@UGent.be (R.D.P.); Bruce.Poppe@UGent.be (B.P.); Kim.DeLeeneer@UGent.be (K.D.L.)
- ² Cancer Research Institute Ghent (CRIG), 9000 Ghent, Belgium; karen.geboes@uzgent.be
- ³ Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University, 128 53 Prague, Czech Republic; jakral@lf1.cuni.cz (J.K.); pboud@lf1.cuni.cz (P.Z.); jana.soukupova@lf1.cuni.cz (J.S.); Petr.Nehasil@vfn.cz (P.N.); Marianna.Borecka@vfn.cz (M.B.); zdekleje@lf1.cuni.cz (Z.K.)
- ⁴ Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic; Michal.Vocka@vfn.cz
- ⁵ Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic; pekleje@lf1.cuni.cz
- ⁶ Center of Medical Genetics UZA/UA, Antwerp University Hospital, 2000 Antwerp, Belgium; bettina.blaumeiser@uantwerpen.be (B.B.); jenneke.vandenende@uantwerpen.be (J.v.d.E.)
- ⁷ Department of Paediatrics and Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic
- ⁸ Digestive Oncology Unit, University Hospital Gasthuisberg, 3000 Leuven, Belgium; sabine.tejpar@uzleuven.be
- ⁹ Department of Clinical Genetics, Maastricht University Medical Centre, 6229 GR Maastricht, The Netherlands; encarna.gomezgarcia@mumc.nl (E.B.G.G.); rien.blok@mumc.nl (M.J.B.)
- ¹⁰ GROW School for Oncology & Developmental Biology, Maastricht University Medical Centre, 6200 MD Maastricht, The Netherlands
- ¹¹ Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic; Marketa.Safarikova@vfn.cz (M.S.); marta.kalousova@lf1.cuni.cz (M.K.)
- ¹² Department of Gastroenterology, Ghent University Hospital, 9000 Ghent, Belgium
- * Correspondence: mjana@lf1.cuni.cz (M.J.); kathleen.claes@ugent.be (K.B.M.C.); Tel.: +420-224965732 (M.J.); +32-9-332-3603 (K.B.M.C.)
- † The authors contributed equally to this work.



Citation: Wieme, G.; Kral, J.; Rosseel, T.; Zemankova, P.; Parton, B.; Vocka, M.; Van Heetvelde, M.; Kleiblova, P.; Blaumeiser, B.; Soukupova, J.; et al. Prevalence of Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposing Genes in Czech and Belgian Pancreatic Cancer Patients. *Cancers* **2021**, *13*, 4430. <https://doi.org/10.3390/cancers13174430>

Academic Editor: Sanjay Gupta

Received: 16 July 2021

Accepted: 27 August 2021

Published: 2 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: We performed genetic analysis of 53 cancer predisposing genes in Belgian and Czech pancreatic cancer patients. In known pancreatic cancer predisposing genes, a high mutation detection ratio was observed in patients with multiple primary tumors and/or a family history of pancreatic or breast, ovarian or colon cancer or melanoma. BRCA1, BRCA2, and ATM were most frequently affected. Pathogenic variants in cancer predisposition genes for which the association with pancreatic cancer has not been firmly established, were less frequent, except for CHEK2. This observation warrants further analyses in other populations. To accurately determine risk associations our study highlights the importance of using a geographically-matched control population.

Abstract: (1) Background: The proportion and spectrum of germline pathogenic variants (PV) associated with an increased risk for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) varies among populations. (2) Methods: We analyzed 72 Belgian and 226 Czech PDAC patients by multigene panel

testing. The prevalence of pathogenic variants (PV) in relation to personal/family cancer history were evaluated. PDAC risks were calculated using both gnomAD-NFE and population-matched controls. (3) Results: In 35/298 (11.7%) patients a PV in an established PDAC-predisposition gene was found. BRCA1/2 PV conferred a high risk in both populations, ATM and Lynch genes only in the Belgian subgroup. PV in other known PDAC-predisposition genes were rarer. Interestingly, a high frequency of CHEK2 PV was observed in both patient populations. PV in PDAC-predisposition genes were more frequent in patients with (i) multiple primary cancers (12/38; 32%), (ii) relatives with PDAC (15/56; 27%), (iii) relatives with breast/ovarian/colorectal cancer or melanoma (15/86; 17%) but more rare in sporadic PDAC (5/149; 3.4%). PV in homologous recombination genes were associated with improved overall survival (HR = 0.51; 95% CI 0.34–0.77). (4) Conclusions: Our analysis emphasizes the value of multigene panel testing in PDAC patients, especially in individuals with a positive family cancer history, and underlines the importance of population-matched controls for risk assessment.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma; overall survival; multigene panel testing; family history; germline

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains a deadly malignancy with a 5-year survival rate of only 9% [1]. Its initial non-specific symptoms makes early diagnosis challenging and less than 20% of PDAC patients have potentially resectable tumors at the time of diagnosis [2]. Although most PDAC cases appear to be sporadic, a familial background has been documented in up to 10% of the patients [2,3]. In addition, increased PDAC prevalence associates with hereditary cancer syndromes caused by germline pathogenic/likely-pathogenic variants (PV) in BRCA2, ATM, BRCA1, PALB2, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, CDKN2A, TP53, or STK11 [3,4]. Germline PV in the four first genes have the highest prevalence in PDAC patients; however, their frequency shows substantial geographic variabilities [5].

Individuals with PV in PDAC-predisposing genes could benefit from intensified preventive surveillance allowing early PDAC detection, when curative surgery may still be feasible [6]. Interestingly, germline PV in cancer susceptibility genes have also been reported in apparently sporadic PDAC cases [7,8]. Several recent reports noticed an improved PDAC prognosis in patients with germline PV in genes encoding proteins involved in DNA damage response (DDR) and, notably, those involved in homologous recombination (HR) to repair DNA double-strand breaks (DSB) [9–11]. In addition, the presence of germline PV in these genes enables tailored treatment by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors (PARPi) [12,13]. The identification of PV allows for predictive testing in affected families to identify relatives at risk.

Multigene panel testing is the preferred method for the identification of germline PV in genetically heterogeneous disorders since it enables fast, reliable, and cost-effective analysis of single nucleotide variants (SNV), short insertions/deletions (indels), and may allow detection of copy number variants (CNV) in predisposition genes, after strong validation [14].

The purpose of this study was to determine and compare the prevalence of germline PV in cancer predisposing genes in identically evaluated sets of Belgian high-risk PDAC patients and Czech unselected PDAC patients. We also aimed to determine the subgroup of PDAC patients who may benefit from multigene panel testing.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Samples

Overall, 226 consecutive Czech PDAC patients (Table 1) diagnosed at the Dept. of Oncology, General University Hospital in Prague between 2015 and 2018 were enrolled. All

patients gave informed consent for their participation, approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague. All patients were Caucasians of Czech origin. The Czech population-matched (PM) controls were described previously and represent 777 non-cancer volunteers aged >60 years that were analyzed identically as the Czech PDAC patients [15].

Table 1. Clinical characteristics of analyzed PDAC patients.

Characteristics	All Patients (n = 298)	Belgian Patients (n = 72)	Czech Patients (n = 226)	p-Value *
Gender				
Female (%)	150 (50.3)	41 (56.9)	109 (48.2)	0.22 a
Male (%)	148 (49.7)	31 (43.1)	117 (51.8)	
Age at PDAC diagnosis; Mean age (SE)	61.9 (0.6)	58.0 (1.4)	63.11 (0.6)	0.002 b
<50 (%)	40 (13.4)	19 (26.4)	21 (9.3)	
50–59 (%)	77 (25.8)	17 (23.6)	60 (26.6)	
60–69 (%)	120 (40.3)	26 (36.1)	94 (41.6)	
70 (%)	61 (20.5)	10 (13.9)	51 (22.6)	
Multiple primary tumors in personal history				
Absent (%)	260 (87.2)	51 (70.8)	209 (92.5)	<0.0001 a
Present (%)	38 (12.8)	21 (29.2)	17 (7.5)	
Multiple primary tumors in personal history				
Breast (%)	19 (6.4)	11 (15.3)	8 (3.5)	0.001 a
Ovarian/endometrial (%)	6 (1.7)	2 (2.8)	4 (1.8)	0.63 a
Colon (%)	7 (2.3)	7 (9.7)	0	<0.0001 a
Melanoma (%)	3 (1.0)	3 (4.2)	0	0.01 a
Other (%)	12 (4.0)	4 (5.6)	8 (3.5)	0.73 a
Family cancer history † (first/second-degree relatives)				
Negative (%)	149 (51.2)	9 (13.6)	140 (62.2)	<0.0001 a
Positive (%)	142 (48.8)	57 (86.4)	85 (37.8)	
Unknown	7	6	1	
Syndromic ‡ tumors in family cancer history				
Pancreatic (%)	56 (19.2)	34 (51.5)	22 (9.8)	<0.0001 a
Breast (%)	59 (20.3)	27 (40.9)	32 (14.2)	<0.0001 a
Ovarian/endometrial (%)	13 (4.5)	4 (6.1)	9 (4.0)	0.50 a
Colon (%)	52 (17.9)	16 (24.2)	36 (15.9)	0.14 a
Melanoma (%)	7 (2.4)	3 (4.5)	4 (1.8)	0.19 a

a Fisher exact test, b Welch t-test, NA—not available, * Belgian vs. Czech subgroups. † Fulfilling criteria for hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC), familial adenomatous polyposis (FAP) or familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM). The considered tumors included PDAC, colorectal, breast, ovarian cancer, and melanoma.

Additionally, 72 Belgian PDAC patients (Table 1) were retrospectively selected from the patient database of the Center for Medical Genetics at Ghent University Hospital (CMGG; n = 62) and other genetic centers in Belgium and the Netherlands (n = 10). Eligible individuals included PDAC patients fulfilling testing criteria for analysis of hereditary cancer syndromes. Patients were counseled between 2000 and 2019 by clinical geneticists of the center and had signed an informed consent agreeing to store their DNA and perform extra analyses in the context of their disease. This study was approved by the ethical committee of Ghent University Hospital. All patients have been selected from strata based on personal or family history (first- and second-degree relatives) of PDAC in combination with breast/ovarian/colon cancer and/or melanoma. Belgian PM controls represent anonymized whole exome sequencing data from 2485 unselected individuals sequenced in CMGG for various non-cancer conditions (intellectual disability, blindness, muscular dystrophies, cardiomyopathies).

2.2. NGS and Bioinformatics

Both centers applied their proprietary NGS panel overlapping in 53 target genes (Table S1). Pathogenic variants in these genes were identified subsequently using the unified prioritization described below.

Czech: Patients' samples were analyzed as described previously [16]. Briefly, a custom-designed panel CZE CANCA (CZEch CANcer paNel for Clinical Application; ver_1.2) was used to capture 226 genes (Table S2). DNA libraries were prepared using KAPA HTP Library Preparation kit (Roche, Basel, Switzerland) and sequenced on MiSeq/NextSeq500 (Illumina, San Diego, CA 92121, USA). NGS data were processed by NovoAlign and annotated by ANNOVAR. Copy number variations (CNVs) were analyzed by CNVkit, medium-size indels by Pindel.

Belgium: Genomic DNA samples were fragmented with the KAPA HyperPlus Library Preparation Kit (Roche). The regions of interest were captured by designed SeqCAP EZ probes targeting 66 genes (Table S3) and sequenced on MiSeq/NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, CA 92121, USA). NGS data were processed using an in-house pipeline. The NGS reads were processed by the bcbio toolkit including data mapping to the reference genome by BWA, variant calling using VarDict, and variant annotation in Ensembl Variant Effect Predictor and dbNSFP/dbSNV databases. Final quality control was performed by FastQC, samtools and bcftools. Coverage was analyzed using mosdepth.

2.3. Variant Prioritization

The same variant prioritization was applied at both sites to identify PV in coding and flanking intronic variants (20 bp) in 53 targeted genes. The prioritization pipeline excluded variants:

- With low variant allele fraction (VAF < 0.15);

- With a high minor allele frequency (MAF > 0.001) in population databases: Exome Sequencing Project (ESP), 1000 Genomes Project and gnomAD, except variants classified pathogenic/likely pathogenic (P/LP) in ClinVar;

- In UTR, non-splice site intronic, synonymous and non-frameshift insertions/deletions, unless classified as P/LP in ClinVar;

- Classified as benign/likely benign (B/LB) in ClinVar, if marked by at least two stars in ClinVar or if classified as B/LB by an expert panel;

- Low risk variants in CHEK2 (c.470C > T; p.I157T), APC (c.3920T > A; p.I1307K), and heterozygous MUTYH variants.

The remaining variants were classified in accordance with the ACMG recommendations [17]. Variants with insufficient or conflicting evidence were categorized as variants of uncertain significance (VUS) as well as truncating variants in the last exon (except ClinVar P/LP). All PV in patients were inspected in Integrative Genomics Viewer (IGV) or confirmed by Sanger sequencing and submitted to ClinVar and LOVD.

2.4. Statistical Analysis

The frequencies of PV in PDAC patients were compared to the frequencies of PV in both region-matched controls and the gnomAD control dataset with the non-Finnish European (NFE) exome data, from release 2.1.1 (restricted to gnomAD exome data) [18]. Associations of PDAC with germline PV in individual genes were analyzed using the Fisher's exact test in different PDAC subgroups. The odds ratios (ORs) and corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated by inverting Fisher's exact test. Bonferroni correction was applied to adjust p-values for the number of mutated genes within each population. All statistical tests were two-sided, and adjusted p-values < 0.05 were considered statistically significant. Association analyses were performed with R (version 3.6.1; The R Foundation).

The Kaplan-Meier product-limit method was used for survival analyses and differences were tested using the log-rank and Mantel-Haenszel tests using the GraphPad Prism v8.0.1

(GraphPad Software) and Statistica v12 (StatSoft) programs. The overall survival (OS) was defined as the interval between PDAC diagnosis and death from PDAC or the last follow-up.

3. Results

3.1. Spectrum and Frequencies of Germline Alterations in PDAC Patients

In total, we detected 61 germline PV in 20 out of 53 genes analyzed in both population cohorts, comprising 72 high-risk Belgian and 226 unselected Czech PDAC patients (Table 2 and Table S4). Thirty-six PV were found in “established PDAC-predisposition” genes (BRCA2, ATM, BRCA1, PALB2, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, CDKN2A, TP53, or STK11 [3,4]) in 35/298 (11.7%) patients. Of these, 30 patients were found to have a PV in one PDAC-predisposition gene, one patient harbored a PV in both MLH1 and MSH6, while four patients inherited a PV in a PDAC-predisposing and another gene (Table 2). BRCA2 (4.0%), ATM (2.7%), and BRCA1 (1.7%) were the most frequently mutated PDAC-predisposition genes. Additionally, in 23 PDAC patients (7.7%) 25 PV were found in other cancer predisposition genes for which a clear association with PDAC has not (yet) been established; one third of them in CHEK2.

Table 2. Prevalence of pathogenic/likely pathogenic variants (PV) in Belgian/Czech patients and controls.

Germline PV	PDAC Patients			Population-Matched Controls	
	All; n = 298	Belgian; n = 72	Czech; n = 226	Belgian; n = 2485	Czech; n = 777
Known PDAC-Predisposition Genes					
ATM *	8 (2.68%)	5 (6.94%)	3 (1.32%)	7 (0.28%)	3 (0.39%)
BRCA1	5 (1.67%)	2 (2.78%)	3 (1.32%)	5 (0.20%)	1 (0.13%)
BRCA2 *	12 (4.01%)	3 (4.17%)	9 (3.98%)	15 (0.60%)	5 (0.64%)
CDKN2A	1 (0.33%)	1 (1.39%)	0	0	0
MLH1 *	3 (1.00%)	3 (4.17%)	0	1 (0.04%)	0
MSH2	0	0	0	2 (0.08%)	3 (0.39%)
MSH6 *	1 (0.33%)	1 (1.39%)	0	2 (0.08%)	0
PALB2	2 (0.67%)	0	2 (0.88%)	4 (0.16%)	2 (0.26%)
PMS2	2 (0.67%)	2 (2.78%)	0	4 (0.16%)	0
STK11	0	0	0	1 (0.04%)	0
TP53	2 (0.67%)	1 (1.39%)	1 (0.34%)	1 (0.04%)	0
PDAC gene PV	36	18	18	42	14
Number of individuals with PDAC PV *	35 * (11.74%)	17 * (23.61%)	18 (7.96%)	42 (1.69%)	14 (1.80%)
Other cancer predisposition genes for which the association with PDAC is not firmly established					
BARD1	0	0	0	1 (0.04%)	0
BLM	0	0	0	3 (0.12%)	3 (0.39%)
BRIP1	2 (0.67%)	0	2 (0.88%)	1 (0.04%)	0
CDK4	0	0	0	1 (0.04%)	0
CHEK1	0	0	0	1 (0.04%)	0
CHEK2 *	8 (2.68%)	3 (4.17%)	5 (2.21%)	11 (0.40%)	1 (0.13%)
ERCC4 *	4 (1.34%)	0	4 (1.76%)	6 (0.24%)	5 (0.64%)
FANCA	0	0	0	6 (0.24%)	3 (0.39%)
FANCC	0	0	0	1 (0.04%)	0
FANCD2	0	0	0	3 (0.12%)	1 (0.13%)
FANCE *	2 (0.67%)	1 (1.39%)	1 (0.44%)	2 (0.08%)	0
FANCG *	1 (0.33%)	0	1 (0.44%)	3 (0.12%)	0
FANCI	0	0	0	3 (0.12%)	1 (0.13%)
FANCL	0	0	0	1 (0.04%)	0
FANCM	1 (0.33%)	1 (1.39%)	0	10 (0.40%)	4 (0.51%)
HOXB13	1 (0.33%)	0	1 (0.44%)	7 (0.28%)	0
MRE11	0	0	0	5 (0.20%)	2 (0.26%)
NBN	3 (1.00%)	0	3 (1.32%)	7 (0.28%)	3 (0.39%)

Table 2. Cont.

Germline PV	PDAC Patients			Population-Matched Controls	
	All; n = 298	Belgian; n = 72	Czech; n = 226	Belgian; n = 2485	Czech; n = 777
POLD1	1 (0.33%)	0	1 (0.44%)	1 (0.04%)	0
POLE	1 (0.33%)	1 (1.39%)	0	1 (0.04%)	0
PTEN	0	0	0	1 (0.04%)	0
RAD50	0	0	0	3 (0.12%)	1 (0.13%)
RAD51C	0	0	0	1 (0.04%)	0
RAD51D	0	0	0	2 (0.08%)	0
RAD54L	0	0	0	7 (0.28%)	2 (0.26%)
RECQL	0	0	0	3 (0.12%)	3 (0.39%)
SLX4 *	1 (0.33%)	1 (1.39%)	0	6 (0.24%)	1 (0.13%)
XRCC2	0	0	0	1 (0.04%)	0
Other gene PV	25	7	16	98	30
Number of individuals with PV in other genes *	23* (7.72%)	7 (9.72%)	16 (7.08%)	98 (3.94%)	30 (3.86%)
All PV	61	25	36	148	45
All PV carriers *	54 * (18.12%)	21 * (29.17%)	33 * (14.60%)	140 (5.63%)	45 (5.79%)

* Multiple germline PV were found in 4 Belgian and 2 Czech PDAC patients with co-occurring PV in PDAC predisposition genes (MLH1-MSH6), in PDAC predisposition and other genes (ATM-FANCE; ATM-SLX4; BRCA2-CHEK2; BRCA2-ERCC4), or in the other genes (CHEK2-ERCC4-FANCG). The frequency of PV in all 4 Lynch syndrome genes was significantly increased in Belgian PDAC patients over Belgian controls (5/72 individuals (6 PV as 1 patient had a PV in both MLH1 and MSH6); 6.94% vs. 9/2485; 0.36%; OR = 20.5; 95%CI 6.7–62.6; $p = 2.9 \times 10^{-11}$).

Gene-specific PDAC risks were calculated for Belgian and Czech patients separately using the respective population-matched controls and for the entire group using gnomAD NFE controls. Genes associated with a significant risk are displayed in Figure 1; risks for all genes with PV are summarized in Table S5.

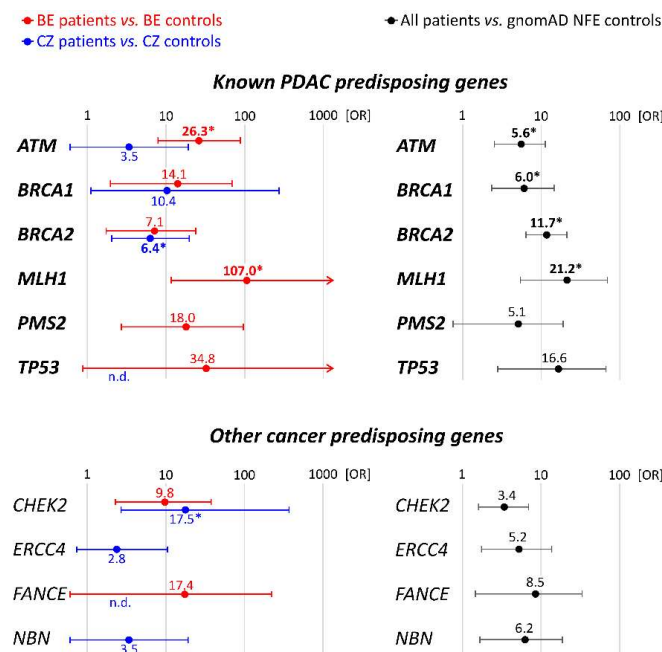


Figure 1. Gene specific PDAC risks in Belgian and Czech PDAC patients (compared with population-matched controls) and all PDAC patients (compared with gnomAD NFE). The plots showing OR and 95%CI describe only genes associated significantly with PDAC Belgian, Czech, or all PDAC patients, respectively. All genes are presented in detail in Table S5. OR values in bold denoted by an asterisk (*) remained significant following Bonferroni correction for multiple testing. n.d.—not determined (zero carriers in population-matched controls).

Considering the established PDAC-predisposition genes, the population-specific PDAC risks were significantly increased for Belgian patients with PV in ATM, BRCA1, BRCA2, MLH1, and PMS2 and for Czech patients with a PV in BRCA1 and BRCA2. A comparison of all PDAC patients with gnomAD-NFE controls confirmed a PDAC risk association for all mentioned genes, except PMS2, but additionally revealed an association with TP53. For the other cancer predisposition genes, a significant association was found for CHEK2 (with both population-matched and gnomAD controls) and for ERCC4, FANCE, and NBN (gnomAD controls only).

In view of the overrepresentation of high-risk PDAC patients in the Belgian group (significant excess of individuals with positive individual/familial cancer history; Table 1), the higher overall frequency of PV in PDAC-predisposition genes in Belgian over Czech PDAC patients (23.6% vs. 8.0%, respectively; $p = 0.001$) was not surprising. In contrast, the proportion of germline PV in other genes did not differ significantly between the Belgian and Czech patients (9.7% and 7.1%, respectively; $p = 0.45$).

3.2. Personal Cancer History

PV in PDAC-predisposition genes were 4-times more frequent in patients with multiple primary tumors (12/38; 31.6%) than in PDAC-only patients (23/260; 8.8%; $p < 0.001$; Figure 2A). PV in 10 PDAC patients with multiple primary tumors affected 3 BRCA1 and 4 BRCA2 (all had also developed breast and/or ovarian cancer), 1 PMS2 and 1 MLH1/MSH6 (both developed colon cancer), and 1 CDKN2A (diagnosed with melanoma). In addition, two patients harbored a PV in a PDAC-predisposition and another gene: ATM/FANCE (PDAC patient with colon cancer) and BRCA2/CHEK2 (early-onset breast cancer PDAC patient). Furthermore, a pathogenic NBN variant was detected in a PDAC patient with breast cancer and a POLE PV in a PDAC patient who had also developed breast and colon cancer.

The proportion of PV carriers in PDAC-predisposition genes did not differ significantly between Belgian and Czech patients with multiple primaries (6/21, 28.6% and 6/17, 35.3%, respectively; Figure 2A), although the fraction of PDAC patients with multiple primary tumors was considerably higher in the Belgian over the Czech group (29.2% vs. 7.5%; Table 1). About one third (31.6%) of the PV in PDAC-predisposition genes (13/36) was identified in patients with multiple primaries, even when they accounted for only 12.8% of the total study population (Figure 2A). Thus, the presence of another primary tumor alongside the PDAC diagnosis increased the chance for a PV in a PDAC-predisposition gene. It is of note that all patients with double primary tumors and a PV in PDAC-predisposition genes, also had a positive family cancer history.

No significant difference in the age of PDAC onset could be established between patients with and without PV in PDAC-predisposition genes (with PV: mean 59.9 years; range 32–82 years; without PV: mean 62.2 years; range 37–84 years; $p = 0.20$). The same observation was done for patients with PV in other genes (mean 62.5 years; range 35–80 years) versus patients without PV ($p = 0.92$).

3.3. Family Cancer History

To overcome differences in clinical characteristics between Belgian and Czech PDAC patients, we assigned all patients into four subgroups (Table 3). Subgroup #1 included patients with a positive PDAC family cancer history. Subgroup #2 included patients with a family history of tumors (breast/ovary/colorectal cancer/melanoma) indicative for PDAC-associated hereditary cancer syndromes. Patients with a negative family cancer history or with non-syndromic tumors in relatives were assigned into additional subgroups according to the age of their PDAC onset (subgroup #3: 60 years; subgroup#4: >60 years). The family cancer history was not detailed enough for 6 Belgian and 1 Czech PDAC patients, hence the family cancer history was only taken into account for 291 PDAC-patients with a detailed familial anamneses.

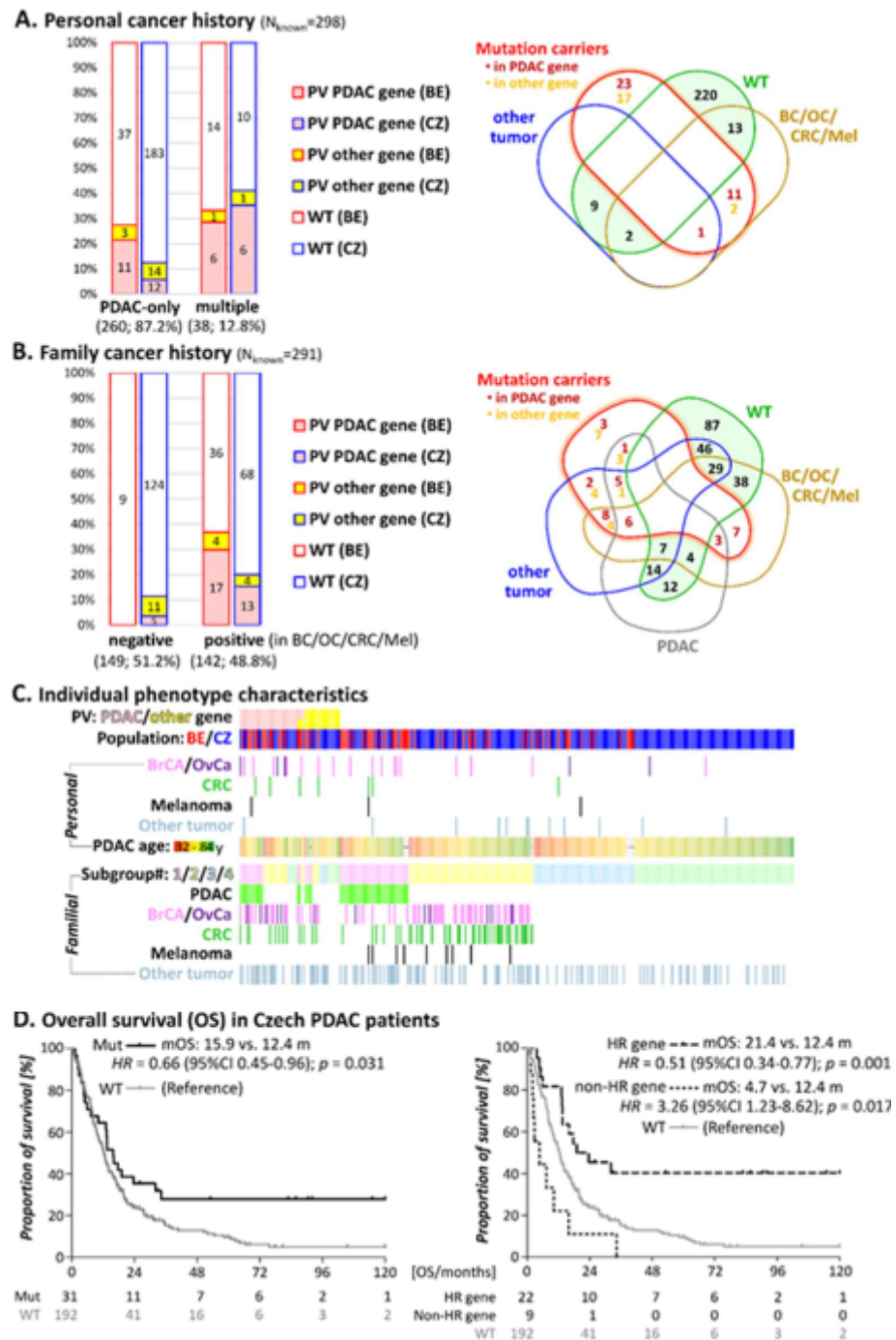


Figure 2. Proportions (left) of patients with PV classified according to personal (A) and family (B) cancer history considering the presence of PDAC, breast cancer (BC), ovarian cancer (OC), colorectal cancer (CRC) or melanoma in first or second degree relative. The types (right) of multiple primary tumors (A) and tumors in the first/second degree relatives (B) are illustrated in a Venn diagram. Individual phenotype characteristics (C) arranged subsequently according to the presence of PV, family cancer history positivity, presence of multiple primary tumors and the age of PDAC onset. Overall survival in the Czech PDAC patients (D) ascertained according to the presence of any germline PV (left) and in PV in HR and non-HR genes, respectively (right). The numbers below the graphs denote the numbers of individual in displayed time points.

Table 3. Prevalence of PV in four subgroups ascertaining 291 patients with known family cancer history.

PDAC Patients Group	All (n = 291); n	Patients with PV		Patients without PV n (%)	p-Value ²
		in PDAC Gene ¹ ; n (%)	in Other Gene Only; n (%)		
Familial cancer patients	142	30 (21.1)	8 (5.6%)	104 (73.2)	0.07
Belgian	57	17 (29.8)	4 (7.0)	36 (63.2)	
Czech	85	13 (15.3)	4 (4.7)	68 (80.0)	
Subgroup#1: 1 PDAC in first/second degree relative	56	15 (26.8)	4 (7.1)	37 (66.1)	0.83
Belgian	34	9 (26.5)	3 (8.8)	22 (64.7)	
Czech	22	6 (27.3)	1 (4.5)	15 (68.2)	
Subgroup#2: 1 Tumor associated with increased PDAC risk in First/second degree relative	86	15 (17.4)	4 (4.7)	67 (77.9)	0.04
Belgian	23	8 (34.8)	1 (4.3)	14 (60.9)	
Czech	63	7 (11.1)	3 (4.8)	53 (84.1)	
Sporadic PDAC patients ³	149	5 (3.4)	11 (7.4)	133 (89.3)	n.d.
Belgian	9	0	0	9 (100)	
Czech	140	5 (3.6)	11 (7.9)	124 (88.5)	
Subgroup#3: Sporadic PDAC, early onset (60 years)	53	1 (1.9)	4 (7.5)	48 (90.6)	n.d.
Belgian	9	0	0	9 (100.0)	
Czech	44	1 (2.3)	4 (9.1)	39 (88.6)	
Subgroup#4: Sporadic PDAC, later onset (>60years)	96	4 (4.2)	7 (7.3)	85 (89.6)	n.d.
Belgian	0	0	0	0	
Czech	96	4 (4.2)	7 (7.3)	85 (89.6)	
Sum	291	35	19	237	

¹ The patients with a PV in both a PDAC-predisposing and other gene were considered in the group of PV in PDAC genes. ² Proportion of Belgian vs. Czech PV in a group. ³ Including patients with other tumors in family cancer history (not associated with PDAC-predisposition syndromes). The family cancer history was not detailed enough for 6 Belgian patients and 1 Czech PDAC patient. n.d.—not determined.

In subgroups #1 and #2 (patients with a positive family cancer history) PV in PDAC-predisposition are much more prevalent than in subgroups #3 and #4 (sporadic) (subgroups #1 and #2: 30/142, 21.1% vs. subgroups #3 and #4: 5/149, 3.4%; $p < 0.001$) (Figure 2B and Table 3).

The proportion of patients heterozygous for PV in established PDAC-susceptibility genes in subgroup #1 (15/56; 26.8%) was similar in Belgian (26.5%) and Czech (27.3%) patients (Table 3) and concerned 5 BRCA2, 3 ATM, 3 Lynch syndrome genes, 2 BRCA1, 1 TP53 and 1 CDKN2A. Additionally, three patients harbored the c.1100delC variant in CHEK2 and another one had a PV in FANCM.

The prevalence of PV in established PDAC-susceptibility genes in subgroup #2 (15/86; 17.4%), was higher in Belgian (34.8%) than in Czech (11.1%) patients ($p = 0.04$; Figure 2B). However, this subgroup retained an increased proportion of higher risk individuals among Belgian patients, including multiple primary cancer patients (8/23; 34.8% vs. 6/63; 9.5%; $p = 0.009$) or first-degree relative(s) with breast and/or ovarian cancers (15/23; 65.2% vs. 23/63; 36.5%; $p = 0.02$; Figure 2C). We also evaluated the presence of “non-syndromic tumors” in the familial cancer history but their occurrence did not contribute to the increased frequency of PV.

In subgroups #1 and #2, the prevalence of PV in cancer predisposition genes for which an association with PDAC has not been established, was low (8/142 (5.6%)). The most frequent were PV in CHEK2 (in three patients from PDAC families and in one colorectal cancer family). PV in BRIP1, FANCM, NBN, and POLE were identified only once each. One Czech PDAC patient harbored a PV in three genes: CHEK2, ERCC4, and FANCG.

Taken together, a family cancer history of PDAC or other syndromic tumors (in 30/35 patients with PV) represented the most important factor indicating a PV in a PDAC-predisposing gene.

Subgroups #3 and #4 included 149 sporadic (mainly Czech) PDAC patients. Only five (3.4%) of them harbored a PV in an established PDAC-predisposition gene, including 2 BRCA2, 2 PALB2, and 1 ATM. Interestingly, the age at PDAC onset in these PV heterozygotes ranged between 59 and 71 years, while no PV in an established PDAC-predisposition gene was identified in the 52 patients diagnosed before the age of 59 years (Figure 2C).

The prevalence of PV in cancer predisposition genes for which an association with PDAC has not been established, was comparable for sporadic (11/149; 7.9%) and familial cases (subgroups #1 and #2: 8/142; 5.6%).

Our data indicate that PDAC patients without a family history of tumors associated with PDAC risk have a lower probability to harbor a clinically actionable PV.

3.4. Survival in Individuals with PV

The overall survival (OS) data were available for 223/226 Czech PDAC patients, including 31/33 patients with PV. The survival ranged between 0.3 and 281.1 months with mean OS 12.8 months for all PDAC patients. Baseline clinicopathological characteristics were similar for patients with and without PV (Table S6), except for the decreased pro-portion of tumors localized in the caput (having better survival) in patients with a PV in non-HR gene.

We first compared OS between patients with and without any PV (Figure 2D, left) and, secondly, with a PV in the genes coding for proteins involved in DSB repair via HR pathway (ATM, BRCA1/FANCS, BRCA2/FANCD1, BRIP1/FANCI, ERCC4/FANCG, FANCD2, FANCG, and PALB2/FANCD1) and with PV in other non-HR genes (CHEK2, HOXB13, NBN, POLD1, and TP53), respectively (Figure 2D, right).

The risk of death was significantly reduced in patients with PV compared to patients without PV (HR = 0.66). Indeed, the mean OS (mOS) was 12.4 months in patients without PV versus 15.9 months in patients with PV. This improved survival was mainly associated with PV in HR genes because the presence of PV in non-HR genes actually led to worse OS (HR = 3.26). In only 4/22 (18.2%) of the patients with a pathogenic HR variant survival was shorter than the mOS (12.4 months), compared to 7/9 (77.8%) of the patients with a PV in a non-HR gene.

4. Discussion

Our study enabled a comparison of germline variations in unselected Czech and high-risk Belgian PDAC patients, for whom no studies have been published previously. The highest clinical utility is attributed to germline variants in genes known to be associated with PDAC predisposition (Table 2) [3]. The most frequently mutated genes in our study included ATM, BRCA1, and BRCA2 (found in 25/35 (71.4%) patients with a PV in a PDAC-predisposition gene). BRCA2 PV were the most frequent, accounting for 17% and 50% of all PV in PDAC-predisposing genes in Belgian and Czech patients, respectively. BRCA2 and BRCA1 code for proteins participating in the DNA DSB repair by HR and are the major genetic factors involved in hereditary breast/ovarian cancer syndromes. PV in both genes were associated independently with a high (OR > 5) and statistically significant PDAC risk in both populations. Interestingly, while in Belgian and Czech breast cancer patients the frequency of BRCA1 germline PV is higher than BRCA2, BRCA2 PV prevails in PDAC patients in both populations [19,20]. Thus, the BRCA2-associated risk could be

higher for pancreatic than for breast cancer, as indicated by our analysis of pooled patients against gnomAD data (BRCA1: OR = 6.0 vs. BRCA2: OR = 11.7; Figure 1). Similar data were presented in the US study of 3030 PDAC patients by Hu and colleagues (OR 2.6 vs. 6.2) [21].

While BRCA2 PV dominated in the Czech patients, ATM PV were the most frequent in Belgian patients (5/72; 6.9%). Biallelic ATM inactivation causes ataxia-telangiectasia while heterozygous variants moderately increase the risk of several tumors including breast or pancreatic cancers [22]. The frequency of ATM PV found in the Belgian subgroup is similar to observations in unselected Canadian PDAC patients (12/177; 6.8%) [23]. In the Czech PDAC patients, the frequency of germline ATM PV was lower (3/226; 1.32%) but still over three-times as high as in population-matched controls (Table 2). Interestingly, all eight ATM PV carriers in our study had a positive family cancer history (this may explain a significant association with the PDAC risk in the Belgian subgroup only, enriched in such patients). An aggregated analysis of all patients showed a high PDAC risk associated with ATM PV (OR = 5.6), comparable with that of BRCA1. Similar ATM-associated risks were calculated in Canadian (OR = 7.7) and US (OR = 5.7) PDAC patients [21,23].

PV in other PDAC-predisposition genes (PALB2, CDKN2A, and TP53) were substantially less frequent (5/35; 14.2% of PV carriers) and their significant associations with PDAC were not reached. However, PV in the mismatch repair genes (MLH1, MSH6, and PMS2) identified in five Belgian (but none in Czech) PDAC patients resulted in a significant association with PDAC collectively (and for MLH1 and PMS2 separately) in the Belgian subgroup. Generally, the prevalence of germline PV in mismatch repair genes in unselected PDAC patients is estimated at 0.3% to 1.3% [8,9,21,24].

Germline PV in cancer predisposition genes for which the association with PDAC has not been firmly established were less frequent. However, CHEK2 PV accounted for 13.1% of all germline PV (identified in 8 of 298 PDAC patients (2.7%)), a proportion comparable to ATM. CHEK2 was initially reported as a multi-organ cancer susceptibility gene associated with breast, prostate, colon, and pancreas cancer, with low-to-moderate penetrance [25]. Nevertheless, the majority of the clinical knowledge was adopted in pre-NGS era and only a few recurrently-analyzed CHEK2 variants were included [26,27]. An increased frequency of CHEK2 PV was reported in several PDAC studies but without statistical significance [10,21,28]. We found an increased population-specific PDAC risk for CHEK2 PV in both Czech and Belgian cohorts and also when considered all patients together (Figure 1). In the three Belgian patients, c.1100delC was identified; the Czech CHEK2 PV spectrum was more diverse, as recently reported in Czech breast cancer patients [15]. Interestingly, 3/5 PDAC patients (one Czech and two Belgians) with the c.1100delC also had one or more relatives diagnosed with PDAC. However, clinical classification of the CHEK2 VUS (dominantly missense variants and short in-frame indels) as well as larger case-control studies in other populations are warranted to further analyze the CHEK2 association with PDAC risk.

The ERCC4 gene was the second most frequently mutated gene among genes with uncertain PDAC risk. Germline ERCC4 inactivations causes xeroderma pigmentosum complementation group F, Cockayne syndrome, or Fanconi anemia complementation group Q [29]. Japanese patients homozygous for ERCC4 p.Arg799Trp or compound heterozygous with another variant were diagnosed with autosomal recessive cerebellar ataxias [29]. Heterozygous carriers were recently described in PDAC patients from the USA and the authors recommended to include ERCC4 into the germline panel testing [11]. We found p.Arg799Trp to be present in 4/226 (1.34%) Czech PDAC patients but also in 5/777 (0.64%) population-matched controls, making the risk in Czech patients insignificant.

The c.657_661del variant in NBN represented another example of a variant prevailing in Czech patients. An association of this variant with PDAC was previously documented in Polish patients and in an independent Czech PDAC cohort [30,31]. In the current study, the c.657_661del variant was more frequent in Czech PDAC patients than in the population-matched controls; however, the difference was not significant. The ERCC4 and NBN

variants exemplify the need for careful analysis of risk, associated with population-specific or founder variants, using appropriate geographically-matched controls [32]. However, the insignificant differences in the overall frequency of PV in non-PDAC established cancer predisposition genes among subgroups of patients considering personal/family cancer history or population origin indicate that the roles of many these genes in PDAC predisposition is limited.

Considering the clinical characteristics of patients with PV, our study demonstrated that a family cancer history is an important risk factor for the identification of a germline PV in PDAC-predisposition genes in both populations. The PDAC patients with first or second degree relatives developing pancreatic/breast/ovarian/colorectal cancer or melanoma have a much higher chance to have a PV in a PDAC-predisposition gene compared to the patients without a family cancer history (OR 7.7; $p = 2.6 \times 10^{-6}$; Table 3).

The difference in PV frequencies in PDAC-predisposition genes between Czech (8.0%) and Belgian (23.6%) PDAC patients were attributable to an ascertainment bias towards high-risk PDAC patients in the Belgian subgroup. The overall PV frequency in unselected Czech PDAC patients (8.0%) corresponded to studies from unselected PDAC patients in the USA (7.7%) [24], or Canada (10.7%) [23]. The frequency of PV in Belgian high-risk PDAC patients insignificantly exceeded the frequencies reported in high-risk PDAC patients from the USA (17.7%) [33] or familial PDAC patients from Germany (16.7%) [34].

To leverage the differences in enrollment of high-risk individuals in Belgian and Czech cohorts, we assigned all patients into subgroups reflecting their family cancer history or PDAC age of diagnosis. The subsequent analysis revealed similar frequencies of PV in PDAC-predisposition genes in Belgian and Czech familial PDAC patients (subgroup #1; 26.5% and 27.3%, respectively). These frequencies were higher than in published studies from Germany (16.7%) [34], the USA (11.9%) [35], and Japan (14.8%) [36]. However it is important to note that there is no uniform definition of familial PDAC and many different working definitions are being used [6,37].

We observed that double primary PDAC/another tumor from breast/ovarian/colorectal/melanoma hereditary cancer spectrum strongly predicts the presence of a germline PV in a PDAC-gene, as described previously [33].

We found no effect of PV presence on the age of PDAC onset, in agreement with previous reports from Canada and the USA [38,39] but in contrast to two other US studies [7,40]. These contradictory results indicate that the association of germline PV with age of onset remains inconclusive. Most experts in current CAPS guidelines do not recommend screening of high risk individuals before the age of 50 with the exception of patients with Peutz-Jeghers syndrome or hereditary pancreatitis [4].

Clinical data from Czech PDAC patients confirmed a positive impact of germline PV, especially in HR genes, on the survival of PDAC patients (21.4 months vs. 12.4 months, Figure 2D). Similar data were reported from Goldstein et al. (17.9 vs. 9.6 months) [11], Fountzilas et al. (22.6 vs. 13.9 months) [10] or Yurgelun et al. (34.4 vs. 19.1 months) [9]. An association of germline PV in non-HR genes with inferior survival (4.7 vs. 12.4; HR = 3.26; $p = 0.017$) needs to be further evaluated because our group consisted of only nine individuals enriched in tumors with prognostically-inferior localization in the pancreas.

The identification of germline PV associated with an increased PDAC risk has important implications for both patients and their relatives. The predictive role of germline PV include application of programmed death receptor-1 (PD-1) pathway inhibitors (in patients with mismatch repair deficiencies) or PARPi (in patients with germline PV in HR genes) [13,41].

There are some limitations to this study. The ascertainment criteria differed between Czech and Belgian patients. The family history of the PDAC patients relied on self-reported family history of PDAC and other cancers, potentially biasing an inaccuracy of medical history. Although multigene panel testing is an effective and cost-effective strategy to identify PV in various genes, the clinical interpretation of cancer risk for multiple moderate penetrance genes remains challenging. To allow formulating consensus guidelines for

medical management of the PV carriers, additional large studies with detailed information on personal and family history are definitively warranted.

5. Conclusions

Our study demonstrated that germline PV in BRCA2, ATM, and BRCA1 are the most frequent in both Belgian and Czech PDAC patients and we confirmed that these are associated with a significantly increased PDAC risk. PV are more frequent among PDAC patients with multiple primary tumors and/or with a positive family history of PDAC or breast/ovarian/colon cancer or melanoma. The presence of PV in BRCA2, ATM, BRCA1, and other HR genes was associated with improved OS in PDAC patients and entails clinically useful prognostic information. Therefore, clinical germline genetic testing of genes increasing the PDAC risk (including BRCA2, ATM, BRCA1, PALB2, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, CDKN2A, TP53, STK11, and possibly also CHEK2) should be offered to all PDAC patients or at least to those with a positive family cancer history or personal history of multiple primary tumors. Beyond the prognostic information, the identification of a germline PV in PDAC patients bears a predictive value enabling tailored anticancer treatment using platinum chemotherapy or PARPi. Moreover, the cascade testing in relatives and intensified cancer surveillance in carriers of a particular PV in a cancer-predisposition gene represent an important approach reducing cancer burden in these high-risk individuals. Our study also highlights the importance of a population-matched control population for establishing correct risk associations.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13174430/s1>, Table S1: Overlapping genes between both panels; Table S2: List of 226 genes Czech CZE CANCA panel; Table S3: List of 66 targeted genes in Belgian SeqCAP panel; Table S4: List of all the (likely) pathogenic variants in PDAC patients; Table S5: Comparison of pathogenic variant frequencies between PDAC cases (BEL + CZE) and control data; Table S6: Baseline characteristics comparing mutation carriers (in HR and non-HR genes) collectively and separately with mutation non-carriers.

Author Contributions: Conceptualization, G.W., K.D.L. and K.B.M.C.; methodology, M.J., T.R., M.V.H., K.D.L. and B.P. (Bram Parton); software, P.Z., P.N., T.R.; formal analysis, P.K., J.S., G.W., T.R. and M.V.H.; investigation, J.K., M.B., G.W. and B.P. (Bram Parton); resources, M.J.B., M.S., M.K., B.B., J.v.d.E., S.T., E.B.G.G., M.B., K.G., R.D.P. and B.P. (Bruce Poppe); data curation, M.V. and G.W.; writing—original draft preparation, J.K., M.J. and G.W.; writing—review and editing, M.J.B., Z.K., K.B.M.C., T.R., B.B., J.v.d.E., S.T., E.B.G.G., M.B., K.G., R.D.P., B.P. (Bruce Poppe) and K.D.L.; visualization, Z.K. and G.W.; supervision, K.D.L. and K.B.M.C.; project administration, K.B.M.C.; funding acquisition, K.B.M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by The King Baudouin foundation (2017-J1140800-207846) and Kom op tegen Kanker (STI.VLK.2017.0007.01), grant projects by Ministry of Health of the Czech Republic (NU20-03-00285 and RVO-VFN 64165), Charles University research projects SVV 260516, PROGRES Q28/LF1.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (NR:1858/14) and Ethics Committee of the General University Hospital in Ghent (2016/0772; 13.07.16).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all PDAC patients involved in the study.

Data Availability Statement: Data sets are available upon request to the corresponding authors (Kathleen Claes and Marketa Janatova) and can be shared after consulting our local institutional review boards.

Acknowledgments: We would like to thank all patients and their families for their participation in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Benzel, J.; Fendrich, V. Familial Pancreatic Cancer. *Oncol. Res. Treat.* **2018**, *41*, 611–618. [[CrossRef](#)]
3. Llach, J.; Carballal, S.; Moreira, L. Familial Pancreatic Cancer: Current Perspectives. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 743–758. [[CrossRef](#)]
4. Goggins, M.; Overbeek, K.A.; Brand, R.; Syngal, S.; Del Chiaro, M.; Bartsch, D.K.; Bassi, C.; Carrato, A.; Farrell, J.; Fishman, E.K.; et al. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: Updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut* **2020**, *69*, 7–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Golan, T.; Kindler, H.L.; Park, J.O.; Reni, M.; Macarulla, T.; Hammel, P.; Van Cutsem, E.; Arnold, D.; Hochhauser, D.; McGuinness, D.; et al. Geographic and Ethnic Heterogeneity of Germline BRCA1 or BRCA2 Mutation Prevalence Among Patients With Metastatic Pancreatic Cancer Screened for Entry Into the POLO Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 1442–1454. [[CrossRef](#)]
6. Hruban, R.H.; Canto, M.I.; Goggins, M.; Schulick, R.; Klein, A.P. Update on familial pancreatic cancer. *Adv. Surg.* **2010**, *44*, 293–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Salo-Mullen, E.E.; O’Reilly, E.M.; Kelsen, D.P.; Ashraf, A.M.; Lowery, M.A.; Yu, K.H.; Reidy, D.L.; Epstein, A.S.; Lincoln, A.; Saldia, A.; et al. Identification of germline genetic mutations in patients with pancreatic cancer. *Cancer* **2015**, *121*, 4382–4388. [[CrossRef](#)]
8. Shindo, K.; Yu, J.; Suenaga, M.; Fesharakizadeh, S.; Cho, C.; Macgregor-Das, A.; Siddiqui, A.; Witmer, P.D.; Tamura, K.; Song, T.J.; et al. Deleterious Germline Mutations in Patients With Apparently Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 3382–3390. [[CrossRef](#)]
9. Yurgelun, M.B.; Chittenden, A.B.; Morales-Oyarvide, V.; Rubinson, D.A.; Dunne, R.F.; Kozak, M.M.; Qian, Z.R.; Welch, M.W.; Brais, L.K.; Da Silva, A.; et al. Germline cancer susceptibility gene variants, somatic second hits, and survival outcomes in patients with resected pancreatic cancer. *Genetic. Med.* **2019**, *21*, 213–223. [[CrossRef](#)]
10. Fountzilas, E.; Eliades, A.; Koliou, G.-A.; Achilleos, A.; Loizides, C.; Tsangaras, K.; Pectasides, D.; Sgouros, J.; Papakostas, P.; Rallis, G.; et al. Clinical Significance of Germline Cancer Predisposing Variants in Unselected Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 198. [[CrossRef](#)]
11. Goldstein, J.B.; Zhao, L.; Wang, X.; Ghelman, Y.; Overman, M.J.; Javle, M.M.; Shroff, R.T.; Varadhachary, G.R.; Wolff, R.A.; McAllister, F.; et al. Germline DNA Sequencing Reveals Novel Mutations Predictive of Overall Survival in a Cohort of Patients with Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 1385–1394. [[CrossRef](#)]
12. Pishvaian, M.J.; Blais, E.M.; Brody, J.R.; Lyons, E.; DeArbeloa, P.; Hendifar, A.; Mikhail, S.; Chung, V.; Sahai, V.; Sohal, D.P.S.; et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: A retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 508–518. [[CrossRef](#)]
13. Golan, T.; Hammel, P.; Reni, M.; Van Cutsem, E.; Macarulla, T.; Hall, M.J.; Park, J.-O.; Hochhauser, D.; Arnold, D.; Oh, D.-Y.; et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 317–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Slavin, T.P.; Niell-Swiler, M.; Solomon, I.; Nehoray, B.; Rybak, C.; Blazer, K.R.; Weitzel, J.N. Clinical Application of Multigene Panels: Challenges of Next-Generation Counseling and Cancer Risk Management. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 208. [[CrossRef](#)]
15. Kleiblova, P.; Stolarova, L.; Krizova, K.; Lhota, F.; Hojny, J.; Zemankova, P.; Havranek, O.; Vocka, M.; Cerna, M.; Lhotova, K.; et al. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 1782–1797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Soukupova, J.; Zemankova, P.; Lhotova, K.; Janatova, M.; Borecka, M.; Stolarova, L.; Lhota, F.; Foretova, L.; Machackova, E.; Stranecky, V.; et al. Validation of CZE CANCA (CZEch Cancer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195761. [[CrossRef](#)]
17. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Genome Aggregation Database (gnomAD). Available online: <http://gnomad.broadinstitute.org/> (accessed on 30 September 2020).
19. Claes, K.; Poppe, B.; Coene, I.; De Paepe, A.; Messiaen, L. BRCA1 and BRCA2 germline mutation spectrum and frequencies in Belgian breast/ovarian cancer families. *Br. J. Cancer* **2004**, *90*, 1244–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Pohlreich, P.; Zikan, M.; Stribrna, J.; Kleibl, Z.; Janatova, M.; Kotlas, J.; Zidovska, J.; Novotny, J.; Petruzalka, L.; Szabo, C.; et al. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7*, R728–R736. [[CrossRef](#)]
21. Hu, C.; Hart, S.N.; Polley, E.C.; Gnanaolivu, R.; Shimelis, H.; Lee, K.Y.; Lilyquist, J.; Na, J.; Moore, R.; Antwi, S.O.; et al. Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA* **2018**, *319*, 2401–2409. [[CrossRef](#)]
22. Armstrong, S.A.; Schultz, C.W.; Azimi-Sadjadi, A.; Brody, J.R.; Pishvaian, M.J. ATM Dysfunction in Pancreatic Adenocarcinoma and Associated Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 1899–1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Cremin, C.; Lee, M.K.-C.; Hong, Q.; Hoeschen, C.; Mackenzie, A.; Dixon, K.; McCullum, M.; Nuk, J.; Kalloger, S.; Karasinska, J.; et al. Burden of hereditary cancer susceptibility in unselected patients with pancreatic ductal adenocarcinoma referred for germline screening. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 4004–4013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Brand, R.; Borazanci, E.; Speare, V.; Dudley, B.; Karloski, E.; Peters, M.L.B.; Stobie, L.; Bahary, N.; Zeh, H.; Zureikat, A.; et al. Prospective study of germline genetic testing in incident cases of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* **2018**, *124*, 3520–3527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cybulski, C.; Górski, B.; Huzarski, T.; Masojć, B.; Mierzejewski, M.; Debniak, T.; Teodorczyk, U.; Byrski, T.; Gronwald, J.; Matyjasik, J.; et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *75*, 1131–1135. [[CrossRef](#)]
26. Stolarova, L.; Kleiblova, P.; Janatova, M.; Soukupova, J.; Zemankova, P.; Macurek, L.; Kleibl, Z. CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells* **2020**, *9*, 2675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lener, M.R.; Kashyap, A.; Kluzniak, W.; Cybulski, C.; Soluch, A.; Pietrzak, S.; Huzarski, T.; Gronwald, J.; Lubinski, J. The Prevalence of Founder Mutations Among Individuals from Families with Familial Pancreatic Cancer Syndrome. *Cancer Res. Treat.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zhan, W.; Shelton, C.A.; Greer, P.J.; Brand, R.E.; Whitcomb, D.C. Germline Variants and Risk for Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Emerging Concepts. *Pancreas* **2018**, *47*, 924–936. [[CrossRef](#)]
29. Doi, H.; Koyano, S.; Miyatake, S.; Nakajima, S.; Nakazawa, Y.; Kunii, M.; Tomita-Katsumoto, A.; Oda, K.; Yamaguchi, Y.; Fukai, R.; et al. Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations. *J. Hum. Genet.* **2018**, *63*, 417–423. [[CrossRef](#)]
30. Lener, M.R.; Scott, R.J.; Kluzniak, W.; Baszuk, P.; Cybulski, C.; Wiechowska-Kozłowska, A.; Huzarski, T.; Byrski, T.; Kładny, J.; Pietrzak, S.; et al. Do founder mutations characteristic of some cancer sites also predispose to pancreatic cancer? *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 601–606. [[CrossRef](#)]
31. Borecka, M.; Zemankova, P.; Lhota, F.; Soukupova, J.; Kleiblova, P.; Vocka, M.; Soucek, P.; Ticha, I.; Kleibl, Z.; Janatova, M. The c.657del5 variant in the NBN gene predisposes to pancreatic cancer. *Gene* **2016**, *587*, 169–172. [[CrossRef](#)]
32. Rump, A.; Benet-Pages, A.; Schubert, S.; Kuhlmann, J.D.; Janavičius, R.; Macháčková, E.; Foretová, L.; Kleibl, Z.; Lhota, F.; Zemankova, P.; et al. Identification and Functional Testing of ERCC2 Mutations in a Multi-national Cohort of Patients with Familial Breast- and Ovarian Cancer. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, 1–18. [[CrossRef](#)]
33. Dudley, B.; Karloski, E.; Monzon, F.A.; Singhi, A.D.; Lincoln, S.E.; Bahary, N.; Brand, R.E. Germline mutation prevalence in individuals with pancreatic cancer and a history of previous malignancy. *Cancer* **2018**, *124*, 1691–1700. [[CrossRef](#)]
34. Bartsch, D.K.; Matthäi, E.; Mintziras, I.; Bauer, C.; Figiel, J.; Sina-Boemers, M.; Gress, T.M.; Langer, P.; Slater, E.P. The German National Case Collection for Familial Pancreatic Carcinoma (FaPaCa)—Knowledge Gained in 20 Years. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2021**, *118*, 163–168. [[CrossRef](#)]
35. Chaffee, K.G.; Oberg, A.L.; McWilliams, R.R.; Majithia, N.; Allen, B.A.; Kidd, J.; Singh, N.; Hartman, A.-R.; Wenstrup, R.J.; Petersen, G.M. Prevalence of germ-line mutations in cancer genes among pancreatic cancer patients with a positive family history. *Genet. Med.* **2018**, *20*, 119–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Takai, E.; Yachida, S.; Shimizu, K.; Furuse, J.; Kubo, E.; Ohmoto, A.; Suzuki, M.; Hruban, R.H.; Okusaka, T.; Morizane, C.; et al. Germline mutations in Japanese familial pancreatic cancer patients. *Oncotarget* **2016**, *7*, 74227–74235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rustgi, A.K. Familial pancreatic cancer: Genetic advances. *Genes Dev.* **2014**, *28*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Grant, R.C.; Selander, I.; Connor, A.A.; Selvarajah, S.; Borgida, A.; Briollais, L.; Petersen, G.M.; Lerner-Ellis, J.; Holter, S.; Gallinger, S. Prevalence of germline mutations in cancer predisposition genes in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* **2015**, *148*, 556–564. [[CrossRef](#)]
39. Smith, A.L.; Alirezaie, N.; Connor, A.; Chan-Seng-Yue, M.; Grant, R.; Selander, I.; Bascuñana, C.; Borgida, A.; Hall, A.; Whelan, T.; et al. Candidate DNA repair susceptibility genes identified by exome sequencing in high-risk pancreatic cancer. *Cancer Lett.* **2016**, *370*, 302–312. [[CrossRef](#)]
40. Yadav, S.; Kasi, P.M.; Bamlet, W.R.; Ho, T.P.; Polley, E.C.; Hu, C.; Hart, S.N.; Rabe, K.G.; Boddicker, N.J.; Gnanaolivu, R.D.; et al. Effect of Germline Mutations in Homologous Recombination Repair Genes on Overall Survival of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2020**, *26*, 6505–6512. [[CrossRef](#)]
41. Le, D.T.; Durham, J.N.; Smith, K.N.; Wang, H.; Bartlett, B.R.; Aulakh, L.K.; Lu, S.; Kemberling, H.; Wilt, C.; Luber, B.S.; et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **2017**, *357*, 409–413. [[CrossRef](#)]

Příloha 3:

Plný text rukopisu v submisi:

Kral J, Jelinkova S, Zemankova P, Vocka M, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Dostalek L, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Chvojka S, Kalousova M, Kosarova M, Koudova M, Krutilkova V, Machackova E, Nehasil P, Novotny J, Otahalova B, Puchmajerova A, Safarikova M, Slama J, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Zikan M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Kleibl Z, Janatova M. **Germline multigene panel testing of Czech patients with endometrial cancer.**

Germline multigene panel testing of Czech patients with endometrial cancer

Jan Kral^{a,p}, Sandra Jelinkova^{a,p}, Petra Zemankova^{a,b,p}, Michal Vocka^{c,d,p}, Marianna Borecka^{a,p}, Leona Cerna^{e,p}, Marta Cerna^{a,p}, Lukas Dostalek^f, Petra Duskova^{g,p}, Lenka Foretova^{h,p}, Ondrej Havranek^{d,i,p}, Klara Horackova^{a,p}, Milena Hovhannisyan^{a,p}, Stepan Chvojka^{e,p}, Marta Kalousova^a, Marcela Kosarova^{j,p}, Monika Koudova^{e,p}, Vera Krutilkova^{k,p}, Eva Machackova^{h,p}, Petr Nehasil^{a,b,l,p}, Jan Novotny^{d,p}, Barbora Otahalova^{a,m,p}, Alena Puchmajerova^{e,p}, Marketa Safarikova^a, Jiri Slama^f, Viktor Stranecky^{l,p}, Ivan Subrt^{n,p}, Spiros Tavandzis^{k,p}, Michal Zikan^o, Tomas Zima^a, Jana Soukupova^{a,p}, Petra Kleiblova^{a,d,p}, Zdenek Kleibl^{a,b,p}, Marketa Janatova^{a,p*}

^a Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague 120 00, Czech Republic

^b Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague 120 00, Czech Republic

^c Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague 120 00, Czech Republic

^d Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague 120 00, Czech Republic

^e Centre for Medical Genetics and Reproductive Medicine, Gennet, Prague 110 00, Czech Republic

^f Gynecologic Oncology Center, Department of Obstetrics and Gynecology First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague 120 00, Czech Republic

^g Laboratory of Molecular Genetics, Hospital Ceske Budejovice, Ceske Budejovice 370 00, Czech Republic

^h Department of Cancer Epidemiology and Genetics, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno 602 00, Czech Republic

ⁱ BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague 252 50, Czech Republic

^j Department of Medical Genetics, Pronatal, Prague 140 00, Czech Republic

^k Department of Medical Genetics, AGEL Laboratories, AGEL Research and Training Institute, Novy Jicin 741 00, Czech Republic

^l Department of Paediatrics and Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague 120 00, Czech Republic

^m Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague 120 00, Czech Republic

ⁿ Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University and University Hospital Pilsen, Pilsen 323 00, Czech Republic

^o Department of Gynecology and Obstetrics, Bulovka University Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University, Prague 180 00, Czech Republic

^p CZEKANCA consortium, Czech Republic

* Corresponding author at: Katerinska 1660/32, Prague 120 00, Czech Republic.

Email address: mjana@lf1.cuni.cz, (M. Janatova)

Abbreviations: ACMG, American College of Medical Genetics; B/LB, benign/likely benign; BC, breast cancer; CI, confidence interval; CNV, copy number variation; CRC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer; EIN, endometrial intraepithelial neoplasia; GATK, The Genome Analysis Toolkit; GGT, germline genetic testing; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; IGV, Integrative Genomics Viewer; LS, Lynch syndrome; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; MMR, mismatch repair; N, number; N.A., not available; NCCN, National Comprehensive Cancer Network; NGS, next generation sequencing; OC, ovarian cancer; OR, odds ratio; P/LP, pathogenic/likely pathogenic; PMC, population-matched controls; PV, pathogenic variant; UTR, untranslated region; VCF, variant-call format; VUS, variant of uncertain significance; WES, whole exome sequencing

Key words: uterine malignancies, endometrial cancer, multigene panel testing, germline mutations

Running title: KRAL *et al.*: GERMLINE MULTIGENE PANEL TESTING OF CZECH PATIENTS WITH ENDOMETRIAL CANCER.

Abstract:

Endometrial cancer (EC) is the most common gynecological malignancy in developed countries. Our study aimed to determine the frequency of germline pathogenic variants (PV) in Czech patients with EC. In this multicenter retrospective cohort study, germline genetic testing (GGT) was performed in 527 EC patients using NGS panel targeting 226 genes, including 5 Lynch syndrome (LS), 14 hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) predisposition genes and 207 candidate predisposition genes. Gene-level risks were calculated using 1662 population-matched controls (PMC). Patients were sub-categorized to fulfill GGT criteria for LS, HBOC, both, or none. Sixty patients (11.4%) carried PV in LS (5.1%) and HBOC (6.6%) predisposing genes, including two carriers of double PV. Compared to non-carriers, PV in LS genes conferred significantly higher EC risk (OR=22.4, 95% CI 7.8-64.3, $p=1.8 \times 10^{-17}$) than the most frequently altered HBOC genes *BRCA1* (OR=3.9, 95% CI 1.6-9.5, $p=0.001$), *BRCA2* (OR=7.4, 95% CI 1.9-28.9, $p=0.002$), and *CHEK2* (OR=3.2, 95% CI 1.0-9.9, $p=0.04$). More than 6 % of EC patients not fulfilling LS or HBOC GGT carried a PV in a clinically relevant gene. Carriers of PV in LS genes had significantly lower age of EC onset than non-carriers ($p=0.01$). Another 11.0% of patients carried PV in a candidate gene (the most frequent were *FANCA*, *MUTYH*); however, their individual frequencies did not differ from PMC (except aggregated frequency of loss-of-function variants in *POLE/POLD1* with OR=10.44, 95% CI 1.1-100.5, $p=0.012$). Our study shows the importance of GGT in EC patients. The significantly increased EC risk for carriers of PV in HBOC genes prompt to include EC diagnosis into HBOC GGT criteria.

1 Introduction

Endometrial cancer (EC) is the most common gynecological malignancy in the developed countries (1). Its rate of incidence per 100,000 people in Europe was 32 and in the Czech Republic was 39 in the year 2020 (<https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>). Most EC cases are diagnosed post-menopausally (with a peak incidence between 65-69 years) and in early stages with relatively favorable prognosis (2). EC mortality is approximately four times lower than EC incidence (<20%; www.svod.cz). However, the mortality may vary based on geography and race (3).

Many non-genetic factors modify EC risk. While excess of endogenous estrogens, obesity, insulin resistance, and tamoxifen use increase EC risk, oral contraceptives and sufficient physical activity have protective effects (4).

The risk of EC development is also affected by genetic factors. Germline pathogenic variants (PV) in known EC-predisposition genes are considered the most clinically important (reviewed in (5)). Germline variants in EC patients were studied by several next generation sequencing (NGS) based studies, dominantly using limited gene panels (21-84 genes) (6-15). These studies reported variable prevalence of germline variants in EC patients ranging from 4.5 to 23%. Majority of hereditary EC cases are associated with Lynch syndrome (LS; also known as hereditary nonpolyposis colorectal cancer; HNPCC), which is caused by germline PV in mismatch repair genes (MMR; *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, and structural alterations of 3' end of *EPCAM*) (16). Guidelines for clinical follow-up of carriers of germline PV in LS genes include specific management of increased EC risk. Modest increase of EC risk has been suggested in *BRCA1* and *BRCA2* PV carriers (most notably the serous-like EC subtype), and other hereditary breast and ovarian cancer genes (HBOC; *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIPI*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*) (17). Other noteworthy candidate EC-predisposition genes include e.g. *POLD1* and *POLE* (18). Germline missense PV affecting proofreading capabilities of *POLE/POLD1* are associated with increased EC risk as a part of polymerase proofreading-associated polyposis, but the importance of germline *POLD1/POLE* truncating variants remains rather elusive (18). Importantly, the genetic basis of most EC cases has not been explained yet as the diagnosis itself is not a criterion for germline genetic testing unless fulfilling LS criteria (5).

We aimed to evaluate germline genetic background of 527 patients with uterine tumors to identify genes associated with EC risk in our population, and to evaluate clinicopathological features in germline PV carriers.

2 Methods

2.1 Patients

For this retrospective cohort study, we collected 527 patients with uterine malignancies diagnosed at nine Czech health care centers (General University Hospital in Prague, Masaryk Memorial Cancer Institute, AGEL Laboratories, Gennet, GHC Genetics, University Hospital Pilsen, Pronatal, Palacky University Olomouc) and the Bank of Clinical Samples (First Faculty of Medicine). The full list of all participating institutions is provided in the Table SI. Patients were enrolled between 2011-2021 and were Caucasians of the Czech origin. The clinicopathological characteristics (Table I) revealed that endometrial cancers (EC; 89.7%) were the dominant type of collected uterine malignancies, therefore the whole cohort of patients

with uterine malignancies will be hereafter referred to as 'EC patients'. Deficient MMR, microsatellite instability and *MLH1* hypermethylation statuses were not available. We divided patients according to national indication criteria for germline genetic testing of LS and/or HBOC patients:

Breast cancer or ovarian cancer (C50/C56) – national indication criteria for germline genetic testing (HBOC criteria):

- Personal history
 - Patient is diagnosed with C50 <45 years OR <50 years, if family history is unknown;
 - Patient has bilateral C50 with the age of diagnosis of the first one <50 years and of both <60 years;
 - Patient is diagnosed with triple negative C50 ≤60 years;
 - Patient is a male diagnosed with C50;
 - Patient is diagnosed with either C56, C57 or C48.2;
 - Patient has a duplicity of C50 and C25 regardless of age;
- Family history
 - Patient and two relatives are diagnosed with C50;
 - Patient and one relative are diagnosed with C50 <50 years or both C50 <60 years (patient included);
 - Patient and a direct relative (parent, sibling, child, alternatively mother or father's sister) are diagnosed with:
 - Ovarian cancer, fallopian tube or primary peritoneal tumor;
 - Triple negative C50/medullar C50;
 - Male relative diagnosed with C50;
 - Pancreatic cancer or prostate cancer with Gleason score ≥7 or primary metastatic C61.

Colorectal cancer or EC – national indication criteria for germline genetic testing (LS criteria):

- Age of diagnosis <50 years;
- Proven microsatellite instability <60 years;

- Patient has a concurrent diagnosis linked to LS (colorectal cancer, stomach cancer, pancreatic cancer, ovarian cancer, small intestine cancer, ureter cancer, renal pelvis cancer, bile tract cancer, glioblastoma);
- Patient and one first degree relative have diagnoses linked to LS <50 years;
- Patient and two second degree relatives have diagnoses linked to LS regardless of the age of diagnosis;
- Patients with colorectal cancer and more than ten adenomas/polyps.

Of all patients 151/527 (28.7%) met only LS genetic testing criteria, 16/527 (3.0%) met only HBOC criteria, and 82/527 (15.6%) met both these criteria. A total of 278/527 (52.7%) patients would not be indicated for germline genetic testing.

The study was approved by Ethics Committees of participating institutions. Written consent for the research analysis was obtained from all participants. Clinicopathological information was collected during genetic counselling or retrieved from patients' record.

Two sets of population-matched controls (PMC) were used for comparisons with analyzed EC patients. First, used as a reference for genetic variant prioritization, included 777 non-cancer volunteers aged >60 years that were analyzed identically with EC patients as described previously (19). Second group, used in case-control analyses, included 1662 PMC analyzed as described previously (20). Briefly, the unselected controls (1170 males and 492 females; median age 57 years, range 18–88 years) were unrelated individuals analyzed by whole-exome sequencing (WES) by National Center for Medical Genomics (<https://ncmg.cz/>) for various noncancer conditions.

2.2 Genetic testing using panel NGS

Genomic DNA was isolated from peripheral blood collected at the time of enrollment in each respective center. DNA samples were analyzed by NGS using a custom-designed CZECANCA panel as described previously with minor modifications (21). These changes have been made to reflect ongoing technological developments. The panel (HyperCap; Roche) targeted 226 genes with known or candidate predisposition to hereditary cancer syndromes (current version v1.2.2, <http://www.czecanca.cz/eng/>). The list of all 226 genes and their full names are specified in Table SII. DNA libraries were prepared using KAPA HyperPlus Library Preparation kit (Roche) according to the manufacturer's instructions using enzymatic fragmentation and were sequenced on Illumina MiSeq/NextSeq500. Resulting NGS data were processed by an in-house

bioinformatics pipeline as described previously (21). Briefly, SAM files were generated from FASTQ using NovoAlign v2.08.03 (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/>) and transformed into BAM by Picard tools v1.129 (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). The Genome Analysis Toolkit (GATK) v3.8.1 (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) (22) was used to prepare VCF (variant-call format), annotated by SnpEff v4.3 (<http://pcingola.github.io/SnpEff/>). Identification of medium size indels was performed by Pindel v0.2.5a7 (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>) and copy number variations (CNV) were detected using CNV kit v0.7.4 (<https://pypi.python.org/pypi/CNVkit>).

All 226 analyzed genes were divided into 19 known EC-predisposition genes described by NCCN guidelines or reviewed by Spurdle *et al.* (5) and 207 other ‘candidate’ genes. Five genes associated with LS (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*) and 14 genes associated with HBOC (*ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*) were considered as the EC-predisposition genes. Remaining 207 candidate cancer-susceptibility genes included those that have been episodically associated with EC predisposition (incl. *APC*, *MUTYH*, *NBN*, *POLD1*, *POLE*; Table SII) (5).

2.3 Variant prioritization

Genetic variants found in patients were filtered, excluding variants:

- with low sequencing quality ($q < 150$);
- with a high minor allele frequency ($MAF > 0.001$) in population databases (gnomAD <https://gnomad.broadinstitute.org/>, Exome Sequencing Project <https://evs.gs.washington.edu/EVS/>, 1000 Genomes Project <https://www.internationalgenome.org/>) (23-25) unless classified as pathogenic/likely pathogenic (P/LP) in the ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (26);
- present more than 3× in a group of 777 PMC, except for variants with P/LP ClinVar classification;
- in UTR (untranslated region), intronic outside of consensus splice sites, synonymous and insertion/deletions not resulting in a frameshift unless classified as pathogenic/likely pathogenic (P/LP) in the ClinVar database;
- classified as benign/likely benign (B/LB) in ClinVar with at least two-star rating;

- low risk variants in *BRCA2* (c.9976A>T; p.Lys3326Ter) and in *CHEK2* (c.470T>C; p.Ile157Thr).

Resulting set of variants was evaluated according to the ACMG (American College of Medical Genetics) recommendations (27). Variants mentioned in ClinVar as a single submitter or with a conflicting interpretation of pathogenicity were categorized as variants of uncertain significance (VUS). Whole gene duplication and truncating variants localized in the last exon were considered VUS, unless they were classified as P/LP in ClinVar. All PV were inspected in Integrative Genomics Viewer (IGV) or confirmed using Sanger sequencing or MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) analysis (MRC Holland). Confirmed PV were submitted to ClinVar database.

2.4 Statistical analysis

The frequencies of PV in EC patients were compared to the frequencies of PV in a group of 1662 unselected PMC. Fisher's exact test or χ^2 was used to analyze association of discovered PV with EC. Differences in age at diagnosis were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's test. *P*-values <0.05 were considered significant. Statistical analysis was performed using the R language v4.1.

3 Results

3.1 Germline PV in patients with uterine malignances

We performed germline genetic testing in 527 Czech EC patients including 249 individuals fulfilling LS, HBOC, LS+HBOC indication criteria and 278 individuals not fulfilling any criteria for germline genetic testing. Germline PV were significantly more frequent in patients (118/527; 22.4%) than in population-matched controls (290/1662; 17.4%; *p*=0.011).

3.1.1 Germline PV in EC-predisposition genes

PV were found in 12 (out of 19 tested) EC-predisposition genes (Table II). Frequency of these variants was more than four-times higher in EC patients (60/527; 11.4%; Table SIII) than in PMC (46/1662; 2.8%; *p*= 9.7×10^{-16}). PV in LS genes were found in 27/527 (5.1%) patients (half of them were *MSH6* PV carriers) and in 4/1662 (0.25%) controls and they represented the strongest genetic risk factor for EC development (OR=22.4, *p*= 1.8×10^{-17}). Interestingly, no *PMS2* PV were observed among patients. *BRCA1*, *BRCA2* and *CHEK2* were the most frequently mutated HBOC genes, and their carriers conferred significantly increased EC risk for their female carriers. However, this risk was lower in comparison to LS genes (ranging from

high EC risk in *BRCA2* to moderate EC risk in *BRCA1* and *CHEK2*, respectively). PV in the remaining 11 HBOC genes were not identified or did not differ significantly from PMC (Table II). Two carriers harbored coincidental mutations in *MLH1/BRCA1* and *MSH2/ATM*, respectively.

3.2 Indication criteria for identification of PV carriers

Among EC patients indicated for germline genetic testing according to the above-mentioned criteria, the proportions of PV carriers fulfilling criteria for LS, HBOC, and both conditions were similar (16.6%, 18.8%, and 18.3%, respectively). These proportions were approximately three-times higher than in EC patients not fulfilling any criteria for germline genetic testing (6.1%; Fig. 1). As expected, the highest proportion of PV in LS genes (11.3%) was detected in a subgroup of patients fulfilling criteria only for LS testing. Similarly, patients meeting solely the HBOC testing criteria had the highest frequency (18.8%) of PV in HBOC genes. Even though the overall percentage of PV carriers differed between subgroups of patients meeting both LS+HBOC genetic testing criteria (18.3%) and not fulfilling any criteria (6.1%), the ratio of carriers of PV in LS:HBOC genes in these two subgroups was similar (5:11 vs 5:12; Table II, Fig. 1). On the other hand, highly penetrant genes (*MLH1*, *MSH2*, *BRCA1*) were predominantly affected in the subgroup fulfilling both criteria, whereas the subgroup of non-indicated patients was characterized by PV in less penetrant genes (*MHS6*, *ATM*).

Moreover, among non-indicated patients we found 2 PVs in HBOC genes in subset of 41 patients with double primary EC and breast cancer (BC; 1×*ATM*, 1×*BRCA1*; 2/41; 4.9%) and 3 PVs in HBOC genes in subset of 31 patients with EC and BC in family cancer history (2×*BRCA2*, 1×*CHEK2*; 3/31; 9.7%).

3.2.1 Germline PV in other candidate cancer predisposition genes

The overall prevalence of PV in remaining candidate genes (identified in 48 out of 207 genes) was significantly higher in EC patients (66/527; 12.5%) compared to controls (139/1662; 8.4%; $p=0.004$; Table SIV). Eight EC patients (and no PMC) carried a coincidental PV in EC-predisposition and candidate genes. Excluding all 60 carriers of PV in EC-predisposition genes, the frequency of PV carriers in other candidate genes was still significantly higher in 467 EC patients (N=58; 12.4 %) in comparison to 1616 PMC (N=139; 8.6%; $p=0.01$). The most frequent PV were found in *MUTYH* (monoallelic PV in 5/467, 1.1%) and *FANCA* (4/467; 0.8%). Their frequencies, however, did not differ from that in PMC (*MUTYH* – 18/1616, 1.1%; *FANCA* – 10/1616, 0.6%).

Interestingly, three patients carried germline truncating variant in the genes coding for DNA polymerases (two in *POLE* and one in *POLD1*) that have been linked to EC-predisposition previously (5). In contrast, only one *POLE* and no *POLD1* mutation was detected in PMC. Thus, the overall frequency of PV in DNA polymerases was significantly higher in EC-predisposition gene negative patients (3/467; 0.6%) than in PMC (1/1616; 0.06%; OR=10.44; 95% CI 1.08-100.51; p=0.012).

Regarding subgroups of patients based on indication criteria for genetic testing, the frequency of PV in candidate predisposition genes (after excluding the carriers of PV in EC-predisposition genes) was significantly higher in patients fulfilling both indication criteria for LS+HBOC (14/67; 20.9%) in comparison to subgroup of patients fulfilling no genetic testing criteria (28/261; 10.7%; p=0.04, Table SIV). The frequencies of PV in patients meeting indication criteria for LS only and HBOC only did not differ significantly (14/126; 11.1% and 2/13; 15.4%, respectively).

3.3 Clinicopathological characteristics in germline PV carriers

The median age at EC onset was significantly lower only in patients with PV in LS genes compared to non-carriers (51.0 vs. 61.4 years, p=0.01, Fig. 2A).

Concerning the histology subtypes (Fig. 2B), the overall frequency of PV in EC-predisposition genes was similar in patients with endometrial carcinoma to those with sarcoma subtypes (39/349, 11.2% and 4/40, 10.0%; respectively); however, no carrier of PV in LS gene was diagnosed with sarcoma. Interestingly, two out of eight patients diagnosed with precancerous EIN (endometrial intraepithelial neoplasia) carried a PV in *BRCA1*. Unfortunately, the histologic subtypes of endometrial carcinomas other than endometrioid were rarely represented, thus the frequencies of PVs in these subgroups cannot be calculated and compared.

Analysis of patients with second primary tumors (Fig. 2C) revealed that the highest frequency of PV in EC-predisposition genes was found in patients with 3 primary tumors and in patients with second primary colorectal cancer (CRC). The proportion between carriers of PV in LS and HBOC genes respected the corresponding indication criteria: the carriers of LS gene variants were enriched in patients with EC+CRC and 3 primary tumors. Accordingly, all 13 patients with 3 primary tumors developed either CRC (N=5) and/or ovarian cancer (OC; N=10). The carriers of PV in HBOC genes were more frequent in patients with EC+OC and EC+BC.

When considering family cancer history (Fig. 2D), the highest frequency (reaching 40%) of PV in EC-predisposition genes were found in small subgroups of patients with family history of multiple primary tumors and family history of ovarian tumors. Not surprisingly, predominant tumor types in a family were in concordance with the elevated frequencies of PV in LS or HBOC genes.

The prevalence of carriers of PV in candidate predisposition genes did not differ from that of non-carriers in any of the clinicopathological category.

The information about immunohistochemistry and microsatellite instability in EC tumor specimens was unavailable.

4 Discussion

Pathogenic germline alterations in LS genes are considered the most significant genetic risk factor for EC predisposition (5). In our study, the carriers of PV in LS genes represented 5.1% of all analyzed EC patients. This frequency is approximately in the middle of frequencies reported by other studies (Fig. 3). Variable frequencies result from inconsistent patients' enrollment criteria. Studies reporting the highest frequency (Tian *et al.* (7), Karpel *et al.* (13), Susswein *et al.* (14), Heald *et al.* (15) with 22.7%, 9.4%, 8.4%, and 8.2% of LS PV carriers, respectively) analyzed high-risk EC patients enriched in individuals with familial LS criteria or in patients with positive MMR gene immunohistochemistry (Tian *et al.* (7)). In contrast, the lowest frequency of PV in LS genes was reported by studies with unselected EC cases, including Huang *et al.* (1.1%), a study of EC samples from The Cancer Genome Atlas (TCGA) (28). We have found similar differences as we identified 22/233 (9.4%) vs. 5/294 (1.7%) carriers of PV in LS genes in LS-indicated vs. LS non-indicated patients, respectively (Fig. 1). Interestingly, despite differences in frequencies of PV in EC patients, the risk of EC development in LS PV carriers was similar in our and LaDuca *et al.* study (OR 22.4 and 20.1, respectively; Fig. 3), the only study among those previously published that quantified the EC risk associated with PV in LS genes (29).

Even though only less than 20% of analyzed EC patients (98/527, 18.6%) met the HBOC germline genetic testing criteria, the overall frequencies of PV carriers in *BRCA1/BRCA2* were unusually high in contrast to other studies (Fig. 3). We identified 11 PVs in *BRCA1* (2.1%) and 7 PVs in *BRCA2* (1.3%). Compared to frequencies of PVs in controls we calculated the risks OR=3.9 for *BRCA1* and OR=7.4 for *BRCA2* (Table II). The risk of EC development associated

with *BRCA1* and *BRCA2* mutations was substantially lower than in LS carriers, and similar to EC risk reported previously by LaDuca *et al.* (29). Our results suggest that PV in *BRCA1/BRCA2* are associated with at least moderate EC risk. Among 16 EC patients meeting only the HBOC criteria, three harbored *BRCA1/BRCA2* mutation. This was also documented by results of a small study by Vietri *et al.* (30), who identified PV in *BRCA1/BRCA2* in 9/21 hereditary EC patients fulfilling HBOC testing criteria. In the group of 82 patients meeting both LS and HBOC testing criteria, *BRCA1* PV were more frequent than PV in LS genes. Moreover, up to 5% and 10% of PVs in HBOC genes were identified in non-indicated EC patients with BC in personal or family cancer history, respectively. This further implies that the diagnosis of EC should be considered as a part of indication criteria for HBOC germline genetic testing irrespective to EC histology subtype. Among PV carriers in other HBOC genes, PV in *CHEK2* and *ATM* were the most frequent. Importantly, PV in *CHEK2* were associated with moderately increased risk (OR=3.2, p=0.04). Mutations in *CHEK2* were associated with predisposition to EC in several studies previously (31).

Our analysis of other candidate genes showed that only PVs in *POLD1* and *POLE* (three truncating variants, one in *POLD1*, two in *POLE*) were significantly associated with EC risk. Germline truncating variants in DNA polymerase genes in our EC patients conferred about 10-times increased risk of EC development. Germline missense PV in both DNA polymerase genes affecting exonuclease domains were previously linked to EC predisposition (5) and their specific somatic missense PV represent important predictive markers for favorable prognosis and/or immune checkpoint therapy in EC patients (32-34). However, the exact risk as well as the overall role of germline truncating variants needs to be further validated in larger cohorts due to the low frequency of *POLD1* and *POLE* mutation carriers.

Analysis of clinicopathological characteristics confirmed an earlier age at disease onset in carriers of LS gene mutations in comparison to non-carriers as referred in other studies (6, 7, 9, 10). The age at EC onset varied even among the carriers of PV in particular LS genes: the carriers of PV in *MSH6* had later age at onset (56 years) compared to the *MLH1/MSH2* PV carriers (48 years), as previously described by Tian *et al* (7). Interestingly, the age at EC onset in carriers of PV in HBOC genes did not differ from non-carriers.

As expected, other differences in clinicopathological characteristics largely corresponded to subgroups of patients classified according to the germline genetic testing criteria. PV in LS genes were most frequently identified in patients with ≥ 3 primary tumors or second primary

CRC in personal cancer history, or multiple primary tumors/CRC in family cancer history. Similarly, carriers of PV in HBOC genes recruited in majority from individuals with BC/OC in personal or family cancer history. On the other hand, clinicopathological characteristics did not differ in carriers of candidate EC-predisposition genes and non-carriers.

Generally and as expected, we have identified majority of PV in the groups of patients fulfilling genetic testing criteria for LS or HBOC with majority of PV in genes related to a corresponding cancer syndrome. Overall, 43/60 PV (71.7%) carriers were indicated for germline genetic testing. Importantly, remaining 17 PV carriers, who would not be indicated for genetic testing using current indication criteria, still represent a significant proportion (28.3%) of cases carrying a germline PV in the LS (*MLH1*, *MSH6*) or the HBOC (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*) genes. Of these, two had double primary tumors and additional 10 had a positive family cancer history. The frequency of PV carriers among EC patients with double primary tumors was 15.4% (33/214). While we have found eight PV carriers in HBOC genes and four carriers in LS genes (including a patient with co-occurrence of *BRCA1* and *MLH1* PV and diagnosed with EC, OC, and BC) in the group of 69 patients with EC and OC (11.6%), we have identified eight carriers of LS genes mutation and only one additional carrier of the *CHEK2* gene mutation (a patient with EC, CRC, and melanoma) in the group of 34 patients with EC and CRC (26.5%). This suggests that the presence of double primary tumors could potentially represent a sole indication criterion for germline genetic testing, as indicated by previous studies (19, 20, 35, 36).

Strengths of our study include homogeneity of studied population consisting of Caucasians, Slavs of the Czech origin and inclusion of PMC that allowed calculation of overall/gene-level risks for EC development. Study limitations include retrospective design and unavailability of EC tumors immunohistochemistry, microsatellite instability and mutation status of *POLE*, which prevented us from correlating presence of germline mutations with different molecular subtypes of EC. Moreover, as approximately a half of analyzed EC patients (292/527, 55.4%) were recruited from the CZECANCA consortium (focused on analyses of genetic cancer predisposition), we cannot exclude a potential bias toward enriched prevalence of PV carriers. To minimize this bias, we divided all enrolled patients according to the testing criteria and analyzed them independently.

In conclusion, over 11% of EC patients carried a germline PV in genes associated with established germline cancer predisposition. EC patients fulfilling LS criteria had five-times

higher chance to carry a LS gene PV than EC patients not fulfilling criteria for germline genetic testing. Presence of PV in LS gene increases the EC risk 20-fold when compared to a non-carriers. However, 28.3% of PV carriers in clinically relevant genes would not be indicated for germline genetic testing using current indication criteria. Therefore, we believe that EC as a second primary tumor in proband or occurrence of EC in a family cancer history should be considered within the indication criteria for germline genetic testing. This is of particular importance for countries where reflex testing is not routinely performed in EC patients.

5 Acknowledgement

We would like to thank all patients and their families for their participation in this study. Additionally, we would like to thank the National Center for Medical Genomics (LM2018132) for providing allelic frequencies in PMC (project CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_046/0015515).

6 Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic grant no. NU20-03-00285, the institutional support for the development of research organization 64165 (General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic) and 00209805 (Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic); the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic grant no. BBMRI-CZ LM2018125, LM2018132, and LX22NPO5102; the Charles University grant GAUK902120, and the Charles University institutional programs SVV260516 and COOPERATIO.

7 Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

8 Author Contribution

SJ, MB, LC, MC, PD, KH, MH, SC, MaKo, MoKo, VK, EM, BO, AP, ST performed the experiments. MV, LD, LF, OH, MaKa, JN, MS, JiS, VS, IS, JaS provided additional data and participated in data analysis and interpretation. PZ and PN administered bioinformatical data curation. JK provided funding, performed experiments, and wrote the manuscript. PK, ZK provided funding and with MJ supervised the study and edited the manuscript. TZ provided funding and with MZ contributed to editing process. All authors read and approved the final manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work.

9 Ethics approval and consent to participate

All patients provided written informed consent. The study was conducted in line with Helsinki Declaration and was approved by The Ethics Committee of General University Hospital in Prague under reference number 11/20 Grant VFN IGP.

10 Patient consent for publication

Not applicable.

11 Competing interests

Zdenek Kleibl declares research funding from Roche, unrelated to the project. No other potential conflicts of interest were reported.

12 References

1. Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F and Jemal A: International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978-2013. *J Natl Cancer Inst* 110: 354-361, 2018.
2. Arend RC, Jones BA, Martinez A and Goodfellow P: Endometrial cancer: Molecular markers and management of advanced stage disease. *Gynecologic oncology* 150: 569-580, 2018.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O and Bray F: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 103: 356-387, 2018.
4. Raglan O, Kalliala I, Markozannes G, Cividini S, Gunter MJ, Nautiyal J, Gabra H, Paraskeva E, Martin-Hirsch P, *et al*: Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. *International journal of cancer* 145: 1719-1730, 2019.
5. Spurdle AB, Bowman MA, Shamsani J and Kirk J: Endometrial cancer gene panels: clinical diagnostic vs research germline DNA testing. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 30: 1048-1068, 2017.
6. Levine MD, Pearlman R, Hampel H, Cosgrove C, Cohn D, Chassen A, Suarez A, Barrington DA, McElroy JP, *et al*: Up-Front Multigene Panel Testing for Cancer Susceptibility in Patients With Newly Diagnosed Endometrial Cancer: A Multicenter Prospective Study. *JCO precision oncology* 5: 1588-1602, 2021.
7. Tian W, Bi R, Ren Y, He H, Shi S, Shan B, Yang W, Wang Q and Wang H: Screening for hereditary cancers in patients with endometrial cancer reveals a high frequency of germline mutations in cancer predisposition genes. *International journal of cancer* 145: 1290-1298, 2019.
8. Cadoo KA, Mandelker DL, Mukherjee S, Stewart C, DeLair D, Ravichandran V, Srinivasan P, Hurley D, Kemel Y, *et al*: Understanding inherited risk in unselected newly diagnosed patients with endometrial cancer. *JCO precision oncology* 3: PO.18.00338, 2019.
9. Long B, Lilyquist J, Weaver A, Hu C, Gnanaolivu R, Lee KY, Hart SN, Polley EC, Bakkum-Gamez JN, *et al*: Cancer susceptibility gene mutations in type I and II endometrial cancer. *Gynecologic oncology* 152: 20-25, 2019.
10. Ring KL, Bruegl AS, Allen BA, Elkin EP, Singh N, Hartman AR, Daniels MS and Broaddus RR: Germline multi-gene hereditary cancer panel testing in an unselected endometrial cancer cohort. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 29: 1381-1389, 2016.
11. Samadder NJ, Riegert-Johnson D, Boardman L, Rhodes D, Wick M, Okuno S, Kunze KL, Golafshar M, Uson PLS, Jr., *et al*: Comparison of Universal Genetic Testing vs Guideline-Directed Targeted Testing for Patients With Hereditary Cancer Syndrome. *JAMA Oncol* 7: 230-237, 2021.
12. Johnatty SE, Pesaran T, Dolinsky J, Yussuf A, LaDuca H, James PA, O'Mara TA and Spurdle AB: Case-case analysis addressing ascertainment bias for multigene panel testing implicates BRCA1 and PALB2 in endometrial cancer. *Hum Mutat* 42: 1265-1278, 2021.
13. Karpel HC, Chern JY, Smith JM, Smith AJ and Pothuri B: Utility of germline multi-gene panel testing in patients with endometrial cancer. *Gynecologic oncology* 165: 546-551, 2022.
14. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, Vogel Postula KJ, Weissman SM, Yackowski L, Vaccari EM, Bissonnette J, Booker JK, *et al*: Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 18: 823-832, 2016.

15. Heald B, Mokhtary S, Nielsen SM, Rojahn S, Yang S, Michalski ST and Esplin ED: Unexpected actionable genetic variants revealed by multigene panel testing of patients with uterine cancer. *Gynecologic oncology* 166: 344-350, 2022.
16. Daniels MS and Lu KH: Genetic predisposition in gynecologic cancers. *Seminars in oncology* 43: 543-547, 2016.
17. de Jonge MM, de Kroon CD, Jenner DJ, Oosting J, de Hullu JA, Mourits MJE, Gomez Garcia EB, Ausems M, Margriet Collee J, *et al*: Endometrial Cancer Risk in Women With Germline BRCA1 or BRCA2 Mutations: Multicenter Cohort Study. *J Natl Cancer Inst* 113: 1203-1211, 2021.
18. Mur P, Garcia-Mulero S, Del Valle J, Magraner-Pardo L, Vidal A, Pineda M, Cinnirella G, Martin-Ramos E, Pons T, *et al*: Role of POLE and POLD1 in familial cancer. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 22: 2089-2100, 2020.
19. Wieme G, Kral J, Rosseel T, Zemankova P, Parton B, Vocka M, Van Heetvelde M, Kleiblova P, Blaumeiser B, *et al*: Prevalence of Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposing Genes in Czech and Belgian Pancreatic Cancer Patients. *Cancers* 13: 4430, 2021.
20. Lhotova K, Stolarova L, Zemankova P, Vocka M, Janatova M, Borecka M, Cerna M, Jelinkova S, Kral J, *et al*: Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer. *Cancers* 12: 956, 2020.
21. Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K, Janatova M, Borecka M, Stolarova L, Lhota F, Foretova L, Machackova E, *et al*: Validation of CZE CANCA (CZEch CANcer paNEl for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS one* 13: e0195761, 2018.
22. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, *et al*: The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research* 20: 1297-1303, 2010.
23. Genomes Project C, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, *et al*: An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491: 56-65, 2012.
24. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, *et al*: The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581: 434-443, 2020.
25. Exome Variant Server NGSPE: Available online: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>. (accessed on 15 March 2022).
26. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM and Maglott DR: ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic acids research* 42: D980-985, 2014.
27. Miller DT, Lee K, Chung WK, Gordon AS, Herman GE, Klein TE, Stewart DR, Amendola LM, Adelman K, *et al*: ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 23: 1381-1390, 2021.
28. Huang KL, Mashl RJ, Wu Y, Ritter DI, Wang J, Oh C, Paczkowska M, Reynolds S, Wyczalkowski MA, *et al*: Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell* 173: 355-370.e314, 2018.
29. LaDuca H, Polley EC, Yussuf A, Hoang L, Gutierrez S, Hart SN, Yadav S, Hu C, Na J, *et al*: A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 22: 407-415, 2020.

30. Vietri MT, D'Elia G, Caliendo G, Casamassimi A, Federico A, Passariello L, Cioffi M and Molinari AM: Prevalence of mutations in BRCA and MMR genes in patients affected with hereditary endometrial cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 38: 13, 2021.
31. Stolarova L, Kleiblova P, Janatova M, Soukupova J, Zemankova P, Macurek L and Kleibl Z: CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells* 9: 2675, 2020.
32. Yen TT, Wang TL, Fader AN, Shih IM and Gaillard S: Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 39: 26-35, 2020.
33. Leon-Castillo A, Britton H, McConechy MK, McAlpine JN, Nout R, Kommoss S, Brucker SY, Carlson JW, Epstein E, *et al*: Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *The Journal of pathology* 250: 323-335, 2020.
34. Green AK, Feinberg J and Makker V: A Review of Immune Checkpoint Blockade Therapy in Endometrial Cancer. *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting* 40: 1-7, 2020.
35. Bychkovsky BL, Lo MT, Yussuf A, Horton C, Richardson M, LaDuca H, Garber JE and Rana HQ: Prevalence and spectrum of pathogenic variants among patients with multiple primary cancers evaluated by clinical characteristics. *Cancer* 128: 1275-1283, 2022.
36. Stolarova L, Jelinkova S, Storchova R, Machackova E, Zemankova P, Vocka M, Kodet O, Kral J, Cerna M, *et al*: Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes. *Biomedicines* 8: 404, 2020.

13 Figures and Tables

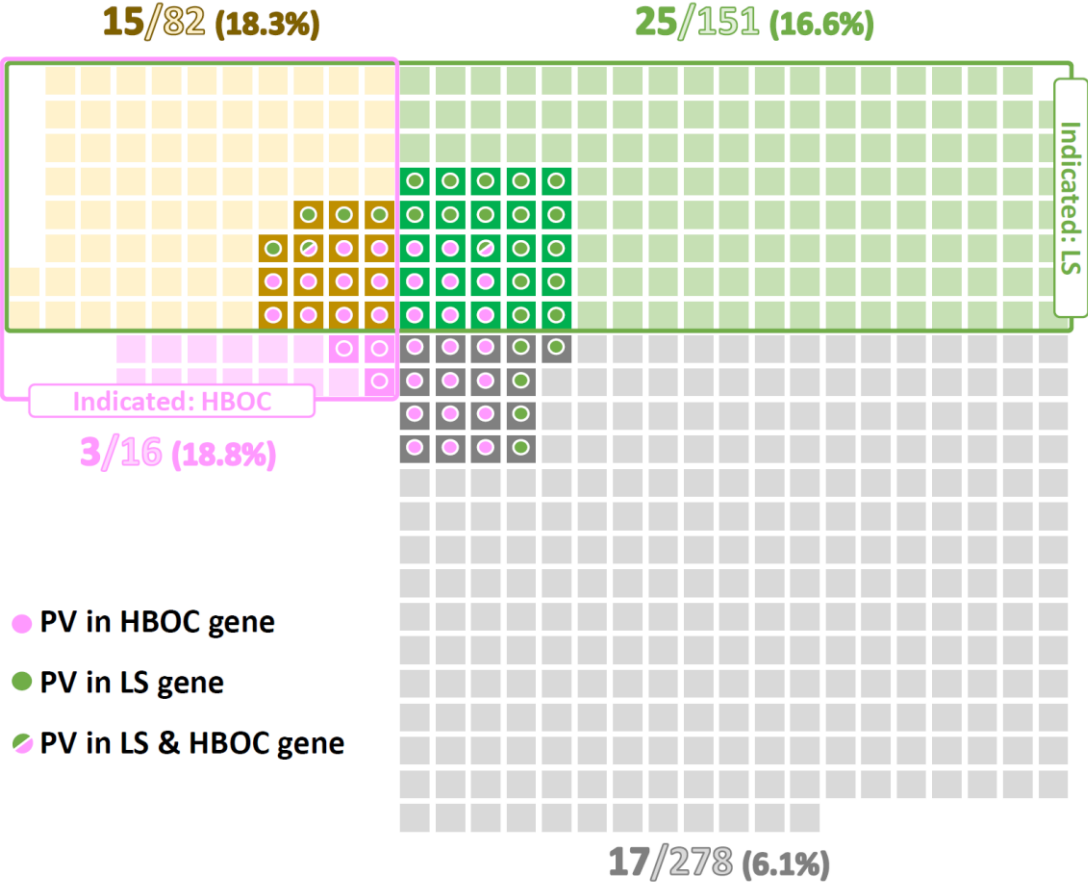


Figure 1. Distribution of PV carriers in patient subgroups based on criteria for germline genetic testing for LS and HBOC, respectively. Squares colored in green, pink, yellow and grey represent individual patients fulfilling criteria for LS only, HBOC only, both criteria, not fulfilling any criteria, respectively. Circles denote carriers of PV in LS genes (green), HBOC genes (pink) or both (green/pink).

HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; PV, pathogenic variant

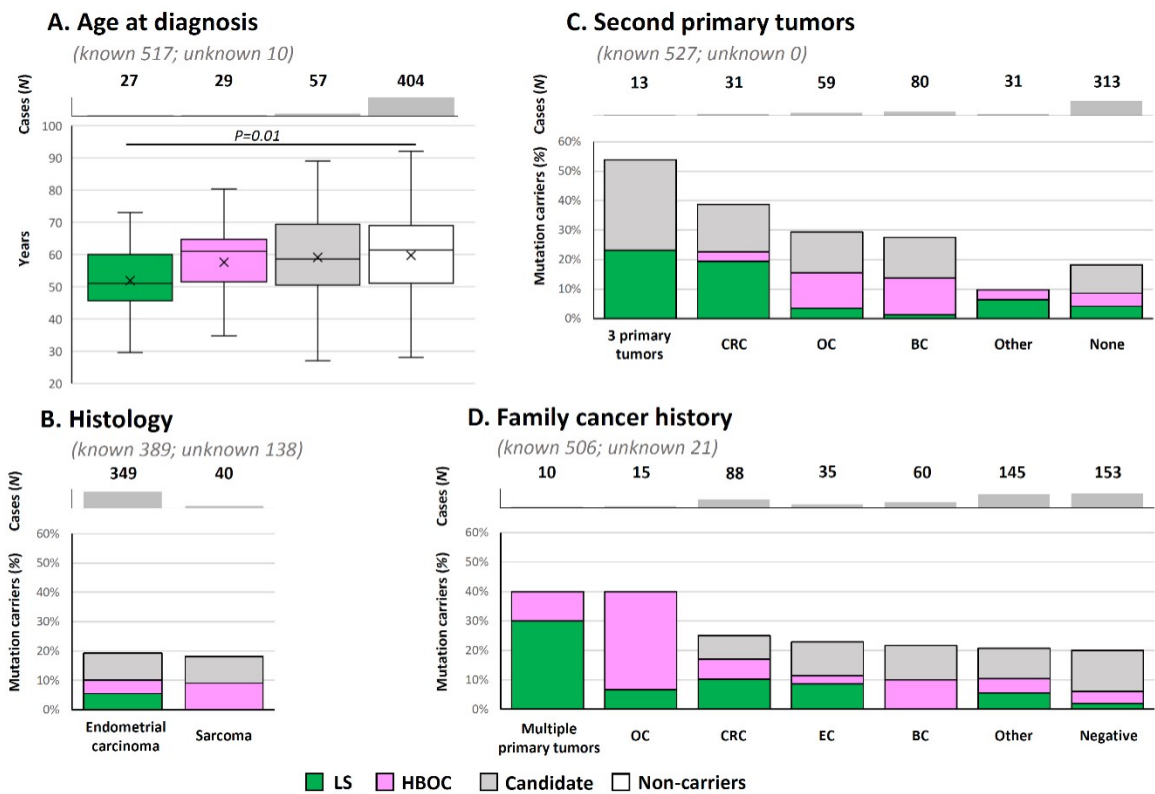


Figure 2. Relative proportion of mutation carriers in clinicopathological subgroups, including (A) Age at diagnosis; (B) Histology; (C) Second primary tumors; (D) Family cancer history in 527 patients. Error bars in (A) visualize the first and the fourth quartile.

BC, breast cancer; CRC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; OC, ovarian cancer

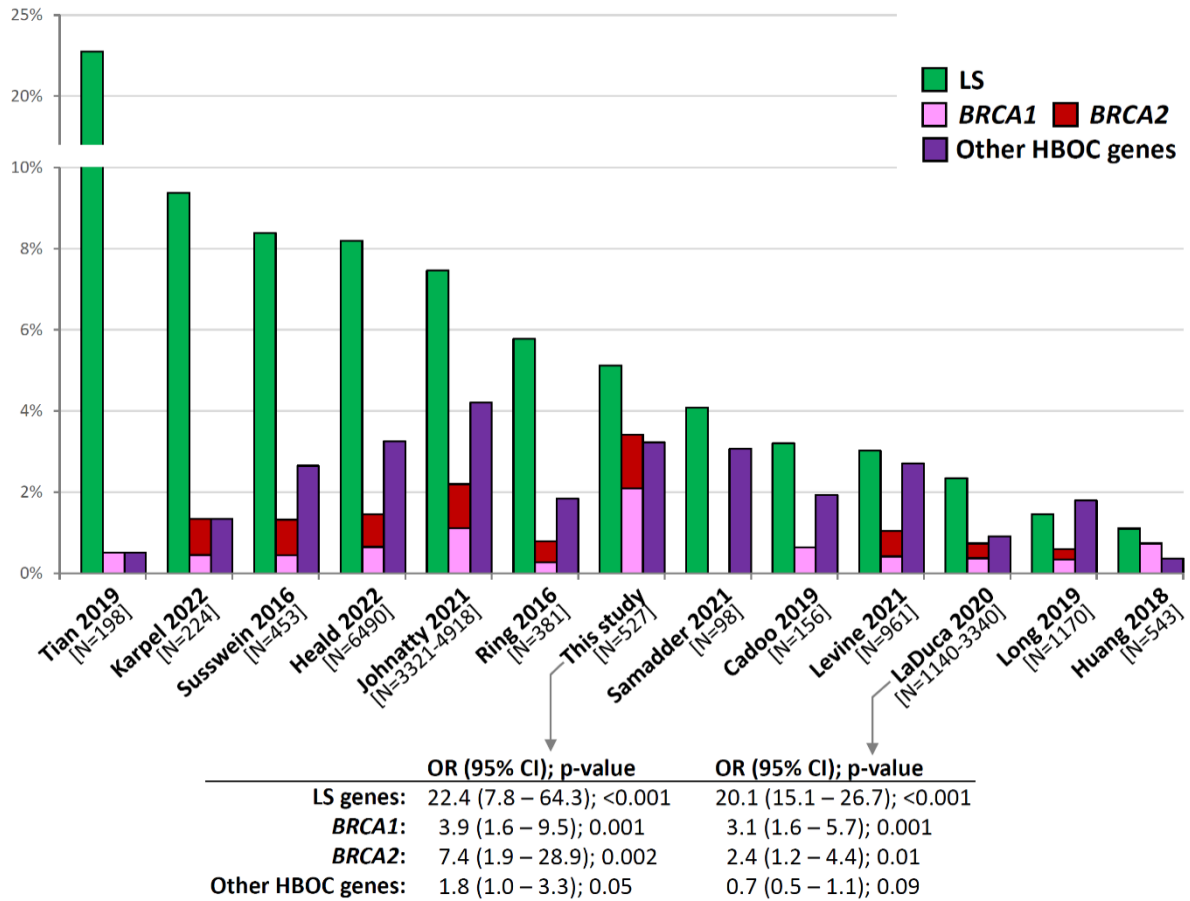


Figure 3. Comparison among previously published studies describing germline PV in EC patients. Green, pink, red and purple bars represent the prevalence of PV in LS genes, *BRCA1*, *BRCA2*, and other HBOC genes (listed in Table II), respectively.

CI, confidence interval; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; N, number; OR, odds ratio

Table I. Clinicopathological characteristics of 527 EC patients.

	All EC pts N=527; (%)	LS only N=151; (%)	HBOC only N=16; (%)	LS+HBOC N=82; (%)	Non-indic. N=278; (%)
Age at EC diagnosis					
- Mean (years)	59.1	50.8	59.0	51.3	65.8
- Median (years)	60.5	47.8	57.0	49.0	65.3
- Range (years)	24-92	24-91	51-73	28.9-81.5	50-92
- <50 (years)	120 (23.2)	79 (53.4)	0	41 (51.3)	0
- ≥50 (years)	397 (76.8)	69 (46.6)	15 (100.0)	39 (48.8)	274 (100.0)
- N.A.	10	3	1	2	4
Histology of uterine malignancies					
Endometrial carcinoma	349 (89.7)	76 (85.4)	8 (72.7)	48 (100.0)	217 (90.0)
- Endometrioid adenocarcinoma	284 (73.0)	65 (73.0)	7 (63.6)	44 (91.7)	168 (69.7)
- Serous	35 (9.0)	4 (4.5)	1 (9.1)	3 (6.3)	27 (11.2)
- Clear cell	7 (1.8)	2 (2.2)	0	0	5 (2.1)
- Undifferentiated	3 (0.8)	0	0	0	3 (1.2)
- Mixed (endometrioid/serous)	3 (0.8)	0	0	0	3 (1.2)
- Mixed (endometrioid/serous/clear cell)	1 (0.3)	1 (1.1)	0	0	0
- Mixed (endometrioid/clear cell)	4 (1.0)	3 (3.4)	0	0	1 (0.4)
- EIN	8 (2.1)	1 (1.1)	0	1 (2.1)	6 (2.5)
- Unspecified	4 (1.0)	0	0	0	4 (1.7)
Sarcoma	40 (10.3)	13 (14.6)	3 (27.3)	0	24 (10.0)
- Leiomyosarcoma	32 (8.2)	9 (10.1)	2 (18.2)	0	21 (8.7)
- Undifferentiated	2 (0.5)	0	0	0	2 (0.8)
- Endometrial stromal sarcoma	3 (0.8)	2 (2.2)	0	0	1 (0.4)
- Unspecified	3 (0.8)	2 (2.2)	1 (9.1)	0	0
Unknown malignant tumor of corpus uteri	138	62	5	34	37
FIGO grade					
- 1	123 (35.9)	35 (48.6)	4 (40.0)	16 (45.7)	68 (30.1)
- 2	100 (29.2)	15 (20.8)	3 (30.0)	12 (34.3)	70 (31.0)
- 3	120 (35.0)	22 (30.6)	3 (30.0)	7 (20)	88 (38.9)
- N.A.	184	79	6	47	52
FIGO stage					
- 0	8 (2.8)	1 (2.1)	0	1 (4.2)	6 (2.8)
- I-	176 (60.9)	33 (68.8)	4 (66.7)	17 (70.8)	122 (57.8)
II	38 (13.1)	5 (10.4)	1 (16.7)	2 (8.3)	30 (14.2)
- III	48 (16.6)	8 (16.7)	1 (16.7)	2 (8.3)	37 (17.5)
- IV	19 (6.6)	1 (2.1)	0	2 (8.3)	16 (7.6)
- N.A.	238	103	10	58	67
Multiple primary tumors in personal history					
- Present	214 (40.6)	69 (45.7)	16 (100.0)	82 (100.0)	47 (16.9)
- Absent	313 (59.4)	82 (54.3)	0	0	231 (83.1)
Multiple primary tumors in personal history					
- CRC	31 (5.9)	31 (20.5)	0	0	0
- OC	59 (11.2)	0	1 (6.3)	58 (70.7)	0
- BC	80 (15.2)	14 (9.3)	15 (93.8)	13 (15.9)	38 (13.7)
- Triple primary EC+(BC/OC/CRC)	13 (2.5)	2 (1.3)	0	11 (13.4)	0
- Other	31 (5.9)	22 (14.6)	0	0	9 (3.2)
- None	313 (59.4)	82 (54.3)	0	0	231 (83.1)
Family cancer history (first/second degree)					
- Positive	353 (69.8)	120 (81.6)	13 (100.0)	56 (73.7)	164 (60.7)
- Negative	153 (30.2)	27 (18.4)	0	20 (26.3)	106 (39.3)
- Unknown	21	4	3	6	8
Tumors in family history					
- EC	35 (6.9)	14 (9.5)	1 (7.7)	6 (7.9)	14 (5.2)
- CRC	88 (17.4)	39 (26.5)	4 (30.8)	15 (19.7)	30 (11.1)
- OC	15 (3.0)	7 (4.8)	1 (7.7)	5 (6.6)	2 (0.7)
- BC	60 (11.9)	14 (9.5)	3 (23.1)	9 (11.8)	34 (12.6)
- Multiple (EC/OC/CRC)	10 (2.0)	10 (6.8)	0	0	0
- Other	145 (28.7)	36 (24.5)	4 (30.8)	21 (27.6)	84 (31.1)
- None	153 (30.2)	27 (18.4)	0	20 (26.3)	106 (39.3)
- Unknown	21	4	3	6	8

Table II. Frequencies of germline PV in 19 EC-predisposition genes. Frequencies of germline PV found in a subgroup of patients fulfilling criteria for germline genetic testing for LS, HBOC, LS+HBOC, individuals not fulfilling any criteria (non-indicated), an aggregated group of all EC patients, and a group of population-matched controls (PMC), respectively.

Gene group	Germline PV	Indication for germline genetic testing				All EC pts N=527 (%)	PMC N=1662 (%)	OR (95% CI); p-value All EC pts vs. PMC
		LS N=151 (%)	HBOC N=16 (%)	LS+HBOC N=82 (%)	Non-indicated N=278 (%)			
Lynch syndrome (LS)	<i>MLH1</i> *	3 (2.0)	0	2* (2.4)	1 (0.4)	6* (1.1)	1 (0.06)	19.1 (2.3-159.1); 1.3×10^{-4}
	<i>MSH2</i> *	6* (4.0)	0	2 (2.4)	0	8* (1.5)	0	N.A.
	<i>MSH6</i>	8 (5.3)	0	1 (1.2)	4 (1.4)	13 (2.4)	0	N.A.
	<i>PMS2</i>	0	0	0	0	0	3 (0.18)	N.A.
	<i>EPCAM</i>	0	0	0	0	0	0	N.A.
	All LS genes	17 (11.3)	0	5 (6.1)	5 (1.8)	27 (5.1)	4 (0.24)	22.4 (7.8-64.3); 1.8×10^{-17}
HBOC	<i>ATM</i> *	1* (0.7)	0	1 (1.2)	3 (1.1)	5* (1.0)	7 (0.42)	2.3 (0.2-7.2); 0.2
	<i>BARD1</i>	0	0	1 (1.2)	0	1 (0.2)	0	N.A.
	<i>BRCA1</i> *	2 (1.3)	2 (12.5)	6* (7.3)	1 (0.4)	11* (2.1)	9 (0.54)	3.9 (1.6-9.5); 0.001
	<i>BRCA2</i>	1 (0.7)	1 (6.3)	0	5 (1.8)	7 (1.3)	3 (0.18)	7.4 (1.9-28.9); 0.002
	<i>BRIP1</i>	0	0	0	1 (0.4)	1 (0.2)	3 (0.18)	1.1 (0.1-10.1); 1.0
	<i>CDH1</i>	0	0	0	0	0	0	N.A.
	<i>CHEK2</i>	3 (2.0)	0	1 (1.2)	2 (0.7)	6 (1.1)	6 (0.36)	3.2 (1.0-9.9); 0.04
	<i>NF1</i>	0	0	0	0	0	1 (0.06)	N.A.
	<i>PALB2</i>	1 (0.7)	0	0	0	1 (0.2)	8 (0.48)	0.4 (0.1-3.1); 0.4
	<i>PTEN</i>	1 (0.7)	0	0	0	1 (0.2)	1 (0.06)	3.2 (0.2-50.5); 0.4
	<i>RAD51C</i>	0	0	2 (2.4)	0	2 (0.4)	2 (0.12)	3.2 (0.4-22.5); 0.2
	<i>RAD51D</i>	0	0	0	0	0	0	N.A.
	<i>STK11</i>	0	0	0	0	0	0	N.A.
<i>TP53</i>	0	0	0	0	0	2 (0.12)	N.A.	
All HBOC	9 (6.0)	3 (18.8)	11 (13.4)	12 (4.3)	35 (6.6)	42 (2.53)	2.7 (1.7-4.3); 7.9×10^{-5}	
All PV	26	3	16	17	62	46		
All carriers	25* (16.6)	3 (18.8)	15* (18.3)	17 (6.1)	60* (11.4)	46 (2.78)		

* Double PV carriers in *MLH1/BRCA1* and *MSH2/ATM*, respectively.

CI, confidence interval; EC, endometrial cancer; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; N, number; N.A., not available; OR, odds ratio; PMC, population-matched controls; pts, patients; PV, pathogenic variant