

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Klára Horáčková

**Charakterizace hereditární komponenty u vysoce rizikových pacientek s
gynekologickými tumory**

**Characterisation of hereditary factors in high-risk patients with
gynecologic cancers**

Disertační práce

Školitel:

RNDr. Jana Soukupová, Ph.D.

Konzultant:

MUDr. Petra Kleiblová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

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

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

V Praze, 5. 9. 2024

Klára Horáčková

Podpis

Identifikační záznam:

HORÁČKOVÁ, Klára. *Charakterizace hereditární komponenty u vysoce rizikových pacientek s gynekologickými tumory [Characterisation of hereditary factors in high-risk patients with gynecologic cancers]*. Praha 2024. 66 s., 4 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Soukupová, Jana.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí své práce RNDr. Janě Soukupové, Ph.D. za všechny její čas, energii a odborné know-how, které mi během práce na tomto disertačním projektu i během další výzkumné a diagnostické činnosti poskytla. Také děkuji RNDr. Markétě Janatové, Ph.D., MUDr. Petře Kleiblové, Ph.D., prof. MUDr. Zdeňkovi Kleiblovi, Ph.D. a Mgr. Petře Zemánkové, Ph.D. za spolupráci na dalších projektech a ochotu pomoci, kdykoliv to bylo potřeba. Dále děkuji všem dalším zaměstnancům Laboratoře onkogenetiky a pracovníkům zapojeným v klinické části projektu, stejně jako účastníkům a jejich rodinám za možnost výzkumné projekty vůbec zrealizovat. V neposlední řadě děkuji všem spolustudentům z Laboratoře onkogenetiky za psychickou a materiální podporu během let studia, hlavně ve formě čokolády a nekorektního humoru, bez kterých by nebylo možné žádný projekt nikdy dokončit. Velké díky také patří mé rodině a kamarádům za jejich podporu během celého studia.

Výzkum hereditární komponenty u vysoce rizikových pacientek s gynekologickými tumory byl podpořen granty Ministerstva zdravotnictví České republiky: NU20-03-00016, NU20-09-00355, NU23-03-00150, NU20-03-00283, NU20-03-00285, RVO-VFN 00064165; Univerzity Karlovy v Praze: COOPERATIO, SVV260516, SVV260631; UNCE/24/MED/022; Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky: Program EXCELES, ID projektu LX22NPO05102 - financováno z Evropské Unie - Next Generation EU; Národního centra lékařské genomiky: LM2023067; German Cancer Aid: 70114178.

Abstrakt

Nádory ovaria (OC) jsou celosvětově u žen zodpovědné za téměř 5 % všech úmrtí způsobených nádorovými onemocněními. Více než polovina OC je diagnostikována v pokročilých stádiích spojených s nepříznivou prognózou (s pětiletým přežitím kolem 50 %). Průměrný věk v době diagnózy se pohybuje okolo 65 let. OC je charakteristické velkým podílem hereditárních tumorů; germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianta (GPV) v nádorových predispozičních genech je identifikována u více než 20 % pacientek. Z těchto pacientek však můžeme vyčlenit specifickou podskupinu s diagnózou OC s časným nástupem (<30 let), u kterých nacházíme atypicky nízký podíl hereditárních forem se záchytem GPV pod 10 %, a tedy nejasnou příčinou vzniku tohoto onemocnění.

Předložená disertační práce se zabývá komplexní genetickou analýzou u pacientek s OC s časným nástupem s využitím celoexomového sekvenování na úrovni jak DNA, tak i RNA doplněného o analýzu polygenního skóre rizika (PRS) a typizace lidských leukocytárních antigenů (HLA). Ve skupině 123 pacientek s diagnózou OC do 30 let věku jsme identifikovali pouze 6 (4,9 %) nosiček GPV ve známých OC predispozičních genech. Výsledky dalších provedených analýz naznačují dva možné alternativní směry dědičnosti. V první řadě dědičnost podobnou karcinomu prsu vycházející: i) z výsledků *overrepresentation* analýzy, která odhalila nabohacení GPV v genech asociovaných s karcinomem prsu; ii) ze zvýšené frekvence nosiček GPV v *CHEK2*, nádorovém predispozičním genu asociovaném s karcinomem prsu; a iii) ze schopnosti SNP setu PRS₃₁₃ stratifikovat mladé OC pacientky od kontrol, přičemž tento SNP set je standardně určen pro stratifikaci žen s ohledem na výši rizika vzniku karcinomu prsu. Druhá trajektorie možné dědičnosti směřuje k imunogenetické nádorové predispozici založené na zvýšené frekvenci nosiček GPV v *LY75-CD302*, genu zapojeném v imunitní odpovědi a antigenní prezentaci, a zvýšené frekvenci nosiček alely HLA-DRB1*11:01, asociované již dříve s predispozicí ke vzniku karcinomu prsu. Imunogenetická predispozice je také podpořena zvýšenou frekvencí HLA homozygotity u pacientek, která ovlivňuje šíři spektra prezentovatelných antigenů. U pacientek s časným OC jsme oproti kontrolám také pozorovali zvýšenou germinální mutační zátěž. Hereditární komponenta u vysoce rizikových pacientek s OC s časným nástupem tedy neodpovídá pouze zavedené Mendelovské monogenní dědičnosti, ale přesahuje i do polygenní dědičnosti a imunogenetiky.

Součástí disertační práce je i analýza přežití pacientek s OC v České republice kompilující výsledky ze dvou studií. Vyvrátili jsme vliv polymorfismu rs2185379 v genu

PRDMI, dříve popsaného u japonské populace, na přežití českých patientek s diagnózou pokročilého OC. Naopak jsme v souladu s předchozími studii zaměřenými na kavkazskou populaci potvrdili, že nosičství *BRCAl/2* GPV, nižší věk pacientky v době diagnózy a histologický typ jiný než *high-grade* serózní OC, především pak *low-grade* serózní OC, představují pozitivní prognostické faktory.

Klíčová slova: hereditární nádorová predispozice, karcinom ovaria, celoexomové sekvenování, zárodečné varianty, skóre polygenního rizika, lidské leukocytární antigeny, analýza přežití

Abstract

Ovarian cancer (OC) accounts for less than 5% of all cancer-related deaths in women worldwide. More than half of OC patients are diagnosed at an advanced stages with an unfavorable prognosis (with a 5-year survival rate of around 50%). The mean age at diagnosis is around 65 years. Characteristics of OC include a high proportion of hereditary cancers - a germline pathogenic/likely pathogenic variant (GPV) in cancer predisposition genes is identified in more than 20% of cases. However, we can distinguish a specific subgroup of early-onset OC patients (<30 years), in whom an atypically low proportion of hereditary forms is identified with a GPV detection rate in established OC predisposition genes falling below 10%. Thus, the genetic predisposition to early-onset OC remains unclear.

The hereby presented thesis focuses on a comprehensive genetic analysis of early-onset OC patients using whole-exome sequencing at both DNA and RNA levels, complemented by polygenic risk score (PRS) analysis and human leukocyte antigen (HLA) typing. In a cohort of 123 patients diagnosed with early-onset OC (<30 years), we identified only 6 (4.9%) GPV carriers in known OC predisposition genes. Furthermore, we proposed two possible alternative trajectories of inheritance. First, a breast cancer-like inheritance supported by the results of: i) the overrepresentation analysis showing GPV enrichment in breast cancer-associated genes; ii) the increased frequency of GPV carriers in *CHEK2*, a known breast cancer predisposition gene; and iii) the discriminatory ability of the PRS₃₁₃ SNP set to stratify young OC patients from controls, which is commonly used to stratify women according to their breast cancer risk. The second trajectory of possible inheritance points to an immunogenetic cancer predisposition based on the increased frequency of GPV carriers in *LY75-CD302*, a gene involved in immune response and antigen presentation; and the increased frequency of the HLA-DRB1*11:01 allele carriers, previously associated with breast cancer predisposition. The immunogenetic predisposition is also supported by the increased frequency of HLA homozygotes in patients compared to controls impairing the spectrum of presentable antigens. Moreover, an increased germline mutation burden was found in patients with early-onset OC compared to controls. Thus, the hereditary component in high-risk early-onset OC patients does not only follow the established Mendelian monogenic inheritance, but also extends to polygenic inheritance and immunogenetics.

The hereby presented thesis also includes a survival analysis of OC patients in the Czech Republic combining the results of two studies. We disproved the survival advantage of the

rs2185379 carriers in *PRDMI* in Czech patients with advanced OC, that has been previously described in the Japanese population. On the contrary, consistent with previously published studies focusing on the Caucasian population, we confirmed that *BRCA1/2* GPV carriership, younger age at diagnosis and histologic type other than high-grade serous, especially low-grade serous OC, are positive prognostic factors.

Key words: hereditary cancer predisposition, ovarian cancer, whole exome sequencing, germline variants, polygenic risk score, human leukocyte antigen, survival analysis

Seznam použitých zkratek

95%CI	95% konfidenční interval
AT	Ataxia-telangiectasia
BC	Karcinom prsu
<i>BRCA1/2</i>	<i>BRCA1</i> a/nebo <i>BRCA2</i>
BTO	<i>Borderline</i> tumory ovaria
C18-20	Zhoubné novotvary tlustého střeva a konečníku
C33-34	Zhoubné novotvary průdušnice, průdušek a plic
C44	Nemelanomové nádory kůže
C48.2	Primární peritoneální nádory
C50	Karcinom prsu
C56	Zhoubné novotvary ovaria
C57	Zhoubné novotvary vejcovodů
C61	Zhoubné novotvary prostaty
CMMRD	Syndrom konstitučního deficitu <i>mismatch repair</i> mechanismů
CNV	Velké přestavby
CrC	Kolorektální karcinom
Ctrl	Kontrola
dg	Diagnóza
EC	Karcinom endometria
EOC	Epiteliální nádor ovaria
ex	Exon
FA	Fanconiho anemie
FBC	Karcinom prsu u žen
FDR	<i>False discovery rate</i>
GPV	Germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianty
HBOC	Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií
HBOPC	Syndrom hereditárního karcinomu prsu, ovarií a pankreatu
HGSC	<i>High-grade</i> serózní karcinom ovaria
HLA	Lidské leukocytární antigeny
HNPCC	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
HR	<i>Hazard ratio</i>
HRMA	<i>High-resolution melting analysis</i>
i	Intron
LGSC	<i>Low-grade</i> serózní karcinom ovaria
LS	Lynchův syndrom
MINAS	<i>Multilocus inherited neoplasia allele syndrome</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MM	Maligní melanom
mut	Mutovaná alela
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
NS	Nesignifikantní
OA	Osobní anamnéza

OC	Nádory ovaria
OC pts	Pacientky s nádory ovaria
OCAC	<i>Ovarian cancer association consortium</i>
PaC	Karcinom pankreatu
PARP	Poly(ADP-ribóza)polymeráza
PrC	Karcinom prostaty
PRS	Skóre polygenního rizika
RA	Rodinná anamnéza
RR	<i>Relative risk</i>
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
sy	Syndrom
TSG	Tumor supresorové geny
VUS	Varianta nejasného významu
WES	Celoexomové sekvenování
wt	<i>Wildtype</i> alela

Obsah

1.	Teoretický úvod.....	13
1.1.	Nádorová onemocnění v ČR	13
1.2.	Hereditární nádorová onemocnění	13
1.3.	Nádory ovaria	15
1.3.1.	Epidemiologie a charakteristika nádorů ovaria	15
1.3.2.	Typy nádorů ovaria.....	16
1.3.3.	Nádory ovaria s časným nástupem	17
1.3.4.	Rizikové faktory pro vznik nádorů ovaria.....	18
1.3.5.	Faktory ovlivňující přežití a úspěšnost léčby u nádorů ovaria	21
2.	Cíle práce.....	23
3.	Metody	24
3.1.	Pacientky a kontroly	24
3.2.	Metody	24
3.2.1.	Příprava DNA a RNA sekvenační knihovny	24
3.2.2.	Bioinformatické a statistické zpracování dat.....	25
3.2.3.	HRMA	25
3.2.4.	Konfirmace nalezených variant.....	26
4.	Výsledky.....	27
4.1.	Komplexní charakterizaci hereditární komponenty nádorů ovaria s časným nástupem vč. charakterizace nových GPV	28
4.1.1.	Analýza germinálních patogenních variant	30
4.1.2.	HLA typizace.....	35
4.1.3.	Analýza PRS.....	36
4.1.4.	Integrovaná genetická analýza	38
4.2.	Asociace germinálních variant a dalších klinickopatologických charakteristik s přežitím u pacientek s nádory ovaria	41

4.2.1.	Polymorfismus rs2185379 v genu <i>PRDMI</i>	43
4.2.2.	GPV v genech <i>BRCAl/2</i>	43
4.2.3.	Věk nástupu onemocnění a menoaaktivita.....	44
4.2.4.	Histologický typ OC.....	45
5.	Diskuse	46
6.	Závěr.....	54
7.	Další publikace autorky.....	56
8.	Seznam použité literatury	58
9.	Přílohy	66

1. Teoretický úvod

1.1. Nádorová onemocnění v ČR

Zhoubné nádory jsou v ČR druhou nejčastější příčinou úmrtí. Dle posledních dostupných údajů bylo nádorové onemocnění v roce 2020 nově diagnostikováno u 84 591 jedinců [1]. Nejčastějšími nádorovými onemocněními v ČR jsou zhoubné nádory prostaty (C61) u mužů a prsu u žen (C50, FBC), následované u obou pohlaví novotvary tlustého střeva a konečníku (C18-C20) a zhoubnými nádory průdušnice, průdušek a plic (C33-C34). Tato nejčastější nádorová onemocnění představují přibližně 50 % všech diagnostikovaných případů zhoubných nádorů mimo nemelanomové nádory kůže (C44). Tři čtvrtiny zhoubných nádorů (mimo C44) jsou diagnostikovány u osob starších 60 let [2].

1.2. Hereditární nádorová onemocnění

K maligní transformaci buňky dochází v důsledku akumulace genetických a epigenetických změn, které funkčně zasahují některé z hlavních buněčných procesů. Tyto charakteristické změny označované jako *hallmarks of cancer* poprvé popsali Hanahan a Weinberg v roce 2000. Mezi základní znaky maligních nádorů patří soběstačnost v produkci růstových signálů, odolnost vůči protirůstovým signálům, narušená regulace apoptózy, neomezený replikační potenciál, cílená indukce cévního zásobení do nádoru, invazivita a schopnost metastazování [3]. Mezi další, následně popsané charakteristické vlastnosti nádorových buněk patří rezistence na imunitní regulaci, genomová nestabilita, deregulace energetického metabolismu a další [4, 5].

Geny, jejichž alterace mohou vést k maligní transformaci buňky, dělíme do dvou hlavních skupin označovaných jako proto-onkogeny a tumor supresorové geny (TSG). Proto-onkogeny kódují proteiny, které v buňce fyziologicky ovlivňují buněčný cyklus, růst a přežívání a působí obecně promitoticky a anti-apoptoticky. V případě akvizice aktivační mutace (*gain-of-function*) dochází k aktivaci proto-onkogenu na onkogen, což typicky vede ke zvýšené produkci (alterovaného) proteinu a následně ke zvýšené proliferaci a inhibici apoptózy. Mutace proto-onkogenů působí dominantně, k jejich aktivaci tedy stačí mutace jedné alely. Naopak TSG kódují proteiny, které negativně regulují buněčný cyklus, růst a přežívání buňky či reparaci DNA, a působí obecně anti-mitoticky a proapoptoticky.

Mutace TSG jsou inaktivující (*loss-of-function*) a mají recesivní charakter, ke ztrátě funkce TSG je potřeba inaktivace obou alel příslušného TSG [6].

Z hlediska genetické nádorové predispozice můžeme rozlišovat nádorová onemocnění sporadická (cca 70 %), familiární (15-25 %) a hereditární (5-10 %). Sporadická nádorová onemocnění vznikají v důsledku akumulace získaných somatických mutací, které následně vedou k maligní transformaci buňky, bez vrozené genetické zátěže a zvýšené incidence nádorových onemocnění v rodině. U nádorových onemocnění familiárních pozorujeme zvýšený výskyt nádorových onemocnění v dané rodině oproti běžné populaci, avšak bez objasnění genetické příčiny tohoto jevu. Příčina familiárních onemocnění je zatím nejasná. Spekuluje se o tom, že k riziku přispívají zděděné polymorfismy v genech s nízkou penetrancí [7, 8]. Naopak hereditární nádorová onemocnění jsou způsobena nosičstvím germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianty (GPV) v některém ze středně až vysoce penetrantních nádorových predispozičních genů. Většina GPV podmiňujících hereditární nádorová onemocnění je identifikována v TSG, kdy nejčastěji alterovanými vysoce penetrantními TSG v naší populaci jsou *BRCA1* a *BRCA2* (dále označováno jako *BRCA1/2*). Existují však i případy hereditárních nádorových onemocnění způsobené nosičstvím GPV v proto-onkogenech, kam řadíme *RET*, *MET* či *KIT*, které jsou však řádově méně časté. U pacientů s hereditární formou nádorového onemocnění je typický časný věk nástupu onemocnění, nádorová multiplicita a pozitivní rodinná anamnéza [9].

Mezi nejčastější hereditární nádorová onemocnění patří syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, HBOC), v současné době označovaný jako syndrom hereditárního karcinomu prsu, ovarií a pankreatu (*Hereditary Breast, Ovarian, and Pancreatic Cancer*, HBOPC). Mezi další charakteristickou manifestaci v HBOPC rodinách také patří karcinom prostaty. V případě HBOPC syndromu jsou nejčastěji identifikovány GPV v genech *BRCA1/2*. Kumulativní celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu přesahuje u nosiček GPV v těchto genech 60 %; riziko vzniku karcinomu ovaria (*Ovarian Cancer*, OC) dosahuje až 58 % v případě GPV v *BRCA1* a až 29 % v případě GPV v *BRCA2*; riziko vzniku karcinomu pankreatu dosahuje až 5 % (GPV v *BRCA1*) a až 10 % (GPV v *BRCA2*); u mužů nosičů GPV v genech *BRCA1/2* je významně zvýšeno riziko vzniku karcinomu prostaty a karcinomu prsu (více v případě GPV v *BRCA2*). Mezi další geny, jejichž GPV predisponují k HBOPC, patří zejména DNA reparační geny *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51C* a *RAD51D*, *mismatch repair* geny a dále geny *CDHI*, *CDKN2A*, *NF1*, *PTEN*, *STK11* či *TP53* [9, 10].

Druhým nejčastějším hereditárním nádorovým onemocněním je hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*, HNPCC) označovaný také jako Lynchův syndrom (LS). LS se nejčastěji manifestuje nádory kolorekta a u žen také endometria a ovaria, ale je asociován i s dalšími typy tumorů jako jsou karcinom pankreatu, žaludku, tenkého střeva, žlučových cest, ureteru a ledvinné pánvičky. LS je geneticky podmíněn přítomností GPV v genech zapojených v *mismatch repair* opravách DNA *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2* [9, 10] a také velkými delecemi postihujícími 3' konec genu *EPCAM*, které funkčně ovlivňují i promotor genu *MSH2* [11].

Další hereditární nádorová onemocnění jsou méně častá (např. familiární adenomatózní polypózy způsobené GPV v genu *APC*, autozomálně recesivní *MUTYH*-asociované polypózy, Li Fraumeni syndrom způsobený GPV v *TP53*) až extrémně raritní (Cowden syndrom způsobený GPV v *PTEN* či Peutz-Jeghers syndrom způsobený GPV v *STK11*) [9, 10, 12].

Ač hereditární nádorová onemocnění představují minoritní část všech pacientů s nádorovým onemocněním, jedná se o skupinu významnou, kterou je možné pomocí germinálního genetického testování identifikovat zavedenými laboratorními postupy. Výsledky onkogenetického testování mají dopad nejen na pacienta, ale i na jeho rodinné příslušníky, a umožňují prevenci či časný záchyt nádorových onemocnění u vysoce rizikových osob [9, 10, 12].

1.3. Nádory ovaria

1.3.1. Epidemiologie a charakteristika nádorů ovaria

S diagnózou nádoru ovaria (C56), pod kterou kromě nádorů ovaria řadíme i tumory vejcovodů (C57) a primární peritoneální nádory (C48.2), je v ČR ročně diagnostikováno téměř 1000 žen (988 v roce 2022). Incidence OC v posledních letech v evropských zemích klesá [13]. V ČR v roce 2022 (poslední dostupná data) incidence dosahovala 18/100,000 žen a mortalita se pohybovala kolem 11/100,000 žen [14]. Průměrný věk v době diagnózy OC v ČR je 66 let [2]. Skupina pacientek s OC s pozdním nástupem (>60 let) tvoří v ČR více než 66 % případů OC. Naproti tomu OC u mladých žen <30 let je raritní a představuje v ČR pouze 1,5 % případů [14].

Ač OC představují 3,4 % nádorových onemocnění žen v ČR (bez C44), v důsledku vysoké mortality jsou zodpovědné za 5 % všech úmrtí způsobených nádorovým onemocněním u žen v ČR [2]. Příčinou vysoké mortality OC je fakt, že u více než dvou třetin pacientek je onemocnění diagnostikováno v pokročilém stádiu (FIGO III-IV), kdy se pětileté přežití pohybuje jen kolem 30 % [14, 15]. Příčinou pozdní diagnózy je absence příznaků u časných stádií OC či později přítomnost nespecifických příznaků jako jsou bolesti břicha, nadýmání, zvýšená potřeba močení nebo nechutenství [16] a zároveň nedostupnost spolehlivého diagnostického nástroje pro detekci časných stádií.

1.3.2. Typy nádorů ovaria

Nádory ovaria jsou heterogenní skupinou onemocnění. Ve většině případů (až 90 % případů) jsou OC epitelálního původu. Vůbec nejčastějším typem OC je tzv. *high-grade* serózní karcinom ovaria (HGSC), který představuje až 70 % epitelálních nádorů. Dalšími typy epitelálních OC jsou nádory endometroidní (cca 10 %), světlobuněčné (cca 10 %), *low-grade* serózní (LGSC, cca 5 %) a mucinózní (cca 3 %). Naopak neepiteliální nádory tvoří pouze zhruba 10 % případů a jedná se např. o tumory germinální, z buněk stromatu a zárodečných pruhů (tzv. *sex-cord stromal*) nebo raritně i o sarkomy a malobuněčné nádory [17]. Zatímco epitelální nádory ovaria převládají u žen s pozdním nástupem onemocnění, neepiteliální nádory jsou typické pro dospívající a mladé dospělé ženy [18].

Mezi dospělými pacientkami můžeme většinou zastoupené epitelální nádory dále rozdělit na prognosticky odlišné nádory typu I a II. OC typu I (LGSC, endometroidní, mucinózní aj.) mají nižší proliferační aktivitu nádorových buněk a jsou spojeny s lepší prognózou. Pro OC typu I je typický pomalejší přechod z benigních stádií do maligních, a jsou tedy typicky diagnostikovány v nižším stádiu [19, 20]. Naopak OC typu II (HGSC aj.) jsou charakterizovány vysokou proliferační aktivitou nádorových buněk, rychlou progresí onemocnění a jsou spojeny s horší prognózou. OC typu II jsou typicky diagnostikovány v pokročilých stádiích [19, 21].

1.3.3. Nádory ovaria s časným nástupem

Průměrný věk v době diagnózy OC se pohybuje kolem 65 let věku - celosvětově se uvádí 63 let [15], v ČR je to v posledních letech 66 let [2]. Záchytnost GPV v TSG spojených se zvýšeným rizikem vzniku OC přesahuje 20 % [22-24]. Mezi pacientkami s OC můžeme však vyčlenit specifickou skupinu pacientek s časným nástupem (před 30 rokem života), u nichž jsou patrné zásadní rozdíly v klinickopatologických charakteristikách oproti ostatním pacientkám (**Tabulka 1**). Pro pacientky s OC s časným nástupem je typická lepší prognóza a pětileté přežití, což může souviset s odlišným zastoupením histologických typů OC a obecně diagnózou v časnějších stádiích [15]. Atypicky nízká je záchytnost GPV v OC predispozičních genech, která se pohybuje pod 10 % [24-26]. S ohledem na uvedené diskrepance této skupiny pacientek s OC <30 let je překvapivé, že bylo dosud provedeno jen několik málo studií zabývajících se analýzou jejich genetických nádorových predispozic, které by pomohly objasnit předpokládanou predispozici k tomuto onemocnění a zlepšit tak diagnostiku a prevenci u žen v reprodukčním a socioekonomicky produktivním věku [27].

Tabulka 1: Srovnání klinickopatologických charakteristik u pacientek s časným (<30 let) vs. pozdním (>60 let) nástupem OC (upraveno podle [27])

Pacientky	S časným nástupem OC	S pozdním nástupem OC
Incidence	1,6/100,000 [15, 28]	22,0/100,000 [15, 28]
Pětileté přežití	58-87 % [29-32] – nižší u LGSC [33]	Cca 50 % [32, 34]
Histologický typ	~40 % epitelální – převládá LGSC [18, 32] ~50 % germinální [18, 35] ~10 % z buněk stromatu a zárodečných pruhů [35, 36]	~ 90 % epitelální – převládá HGSC (70 %) [20, 37] ~ 6 % z buněk stromatu a zárodečných pruhů [38] ~3 % germinální [38]
Stádium onemocnění v době dg.	Lokalizované [15, 34]	Pokročilé [15, 34]
Nosičky GPV v OC predispozičních genech	<10 % [24-26]	>20 % [22-24]

Dg., diagnóza; GPV, germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianta; HGSC, *high-grade* serózní karcinom ovaria; LGSC, *low-grade* serózní karcinom ovaria; OC, nádory ovaria

1.3.4. Rizikové faktory pro vznik nádorů ovaria

Celoživotní kumulativní riziko pro vznik OC se pohybuje kolem 1,1 % [15]. Faktorem, který toto riziko významně ovlivňuje, je působení pohlavních hormonů související s dlouhodobým užíváním hormonální antikoncepce, paritou, časným nástupem menstruace nebo pozdním nástupem menopauzy [39-41]. Obecně lze říci, že počet let ovulace pozitivně koreluje s rizikem vzniku OC [42]. Dále je popisováno vyšší riziko vzniku OC u žen s nadváhou či obezitou [43]. Nejvíce ale relativní riziko zvyšuje pozitivní rodinná anamnéza OC, která úzce souvisí s HBOPC syndromem [44].

OC patří mezi nádorová onemocnění s nejvyšším podílem hereditární formy přesahující 20 %, dle některých studií dokonce i >30 % [22, 23, 38]. Hereditární OC je spojen s přítomností GPV ve středně až vysoce penetrantních nádorových predispozičních genech (**Tabulka 2**), jejichž produkty jsou nejčastěji zapojeny v opravách poškození DNA, zejména mechanismem homologní rekombinace nebo *mismatch repair*. Nejčastěji jsou identifikovány GPV ve vysoce penetrantních genech *BRCA1/2*, a to až ve 20 % případů OC [45]. Dalšími často alterovanými geny jsou *RAD51C*, *RAD51D* a *BRIP1* [46, 47]. Riziko OC je také přidruženo k diagnóze LS, tedy nosičkám GPV v genech *MLH1*, *MHS2/EPCAM*, *MSH6* a *PMS2* [48]. U pacientek s OC nacházíme také GPV ve středně penetrantních genech *ATM* a *PALB2* [49-51]. Některé specifické subtypy OC neepiteliálního původu jsou asociované s raritními syndromy způsobenými genetickými alteracemi v genech jako je *STK11*, *DICER1* a *SMARCA4* [52-54].

Mimo známé predispoziční geny se v asociaci s OC diskutují i další kandidátní. Patří mezi ně z velké části predispoziční geny se známou asociací a rizikem pro jiná nádorová onemocnění. Jedná se např. o vysoce penetrantní geny jako jsou *APC*, *PTEN* nebo *TP53* [55-57]. Dále je také možné v literatuře najít potenciální asociace OC s GPV ve středně penetrantních genech jako je *BARD1* nebo *CHEK2* [23, 58], jejichž nádorová predispozice a rizika jsou již popsána u FBC. Kandidáty jsou také další geny, jejichž produkty jsou zapojeny v opravách DNA nebo odpovědi na poškození DNA, jako jsou geny Fanconiho anémie, např. *FANCA*, *FANCC*, *FANCL*, *FANCM* a *SLX4* [59, 60], nebo MRN komplexu, tj. *MRE11-RAD50-NBN* [61, 62]. Nicméně asociaci kandidátních genů je potřeba ověřit ve velkých studiích doplněných ideálně i o funkční analýzy, pomocí kterých by bylo možné po preciznější charakterizaci a klasifikaci identifikovaných variant, z nichž většina jsou dosud varianty nejasného významu (*Variant of Uncertain Significance*, VUS), upřesnit rizika.

Tabulka 2: Známé predispoziční geny asociované s nádory ovaria (upraveno podle [27])

Gen	Projevy u nosičů GPV v heterozygotní formě			Projevy u nosičů GPV v homozygotní/složené heterozygotní formě [63]
	Typ asociovaného OC	Absolutní riziko vzniku OC [10]	Další asociovaná nádorová onemocnění [10]	
Vysoce penetrantní geny				
<i>BRCA1</i>	Epiteliální [49]	39-58 %	BC, PaC, PrC	FA-S
<i>BRCA2</i>	Epiteliální [49]	13-29 %	BC, PaC, PrC, MM	FA-D1
<i>BRIP1</i>	Epiteliální [49]	5-15 %	BC, CrC, EC	FA-J
<i>DICER1</i>	Neepiteliální - z buněk stromatu a zárodečných pruhů [53]	-	DICER1 sy	-
<i>MLH1</i>	Epiteliální [48, 49]	4-20 %	Lynch sy - CrC, EC, PaC	CMMRD
<i>MSH2</i>	Epiteliální [48]	8-38 %	Lynch sy - CrC, EC, PaC	CMMRD
<i>RAD51C</i>	Epiteliální [49]	10-15 %	BC	FA-O
<i>RAD51D</i>	Epiteliální [49]	10-20 %	BC	-
<i>SMARCA4</i>	Neepiteliální - malobuněčný, hyperkalcemický typ [54]	-	Familiární rhabdoidní nádory	-
<i>STK11</i>	Neepiteliální [52]	>10 %	Peutz-Jeghers sy, BC, PaC, CrC	-
Středně penetrantní geny / Geny bez jasné asociace s onemocněním				
<i>ATM</i>	Epiteliální [49]	2-3 %	PaC	AT
<i>MSH6</i>	Epiteliální [48]	1-13 %	Lynch sy - CrC, EC, PaC	CMMRD
<i>PMS2</i>	Epiteliální [48]	1-3 %	Lynch sy - CrC, EC	CMMRD
<i>PALB2</i>	Epiteliální [50]	3-5 %	BC, PaC	FA-N

AT, ataxia-telangiectasia; BC, karcinom prsu; CMMRD, syndrom konstitučního deficitu *mismatch repair* mechanismů; CrC, kolorektální karcinom; EC, karcinom endometria; FA, Fanconiho anemie; GPV, germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianta; MM, maligní melanom; OC, nádory ovaria; PaC, karcinom pankreatu; PrC, karcinom prostaty; sy, syndrom

Mimo klasickou monogenní Mendelovskou dědičnost byly v souvislosti s OC popsány i další alternativní mechanismy genetické nádorové predispozice. Ojedinele jsou popisovány případy pacientek s OC, u nichž byly identifikovány bialelické [64, 65] nebo *de novo* GPV [66, 67] v etablovaných nádorových predispozičních genech. Dále jsou také separátně studováni nosiči více než jedné GPV ve středně až vysoce penetrantním genu, tzv. MINAS (*Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome*) [68]. V neposlední řadě byla také u pacientek s OC zkoumána X-vázaná dědičnost, a to jak ve spojitosti s pozitivní nádorovou rodinnou anamnézou bez známé GPV po mateřské [69] i otcovské linii [70], tak i na úrovni nenáhodné inaktivace chromozomu X [71, 72]. Ve spojitosti s X-vázanou dědičností u OC se zkoumá i možnost tzv. modifikátorů, které mají vliv na nástup onemocnění, a konkrétně polymorfismus rs176026 v genu *MAGEC3* lokalizovaném na chromozomu X byl asociován u OC pacientek s dřívějším nástupem onemocnění [70].

V posledních letech se u solidních nádorů hodně diskutuje a experimentálně testuje tzv. skóre polygenního rizika (*Polygenic Risk Score*, PRS) [73]. PRS je již poměrně podrobně zkoumáno u pacientek s karcinomem prsu [74, 75], a to včetně české populace [76]. Nicméně asociace PRS u OC je méně jasná. V průběhu posledních let proběhlo několik pokusů o vytvoření OC specifického SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) setu čítajícího několik jednotek až desítek testovaných polymorfismů [73, 77-81]. Aktuálně nejužívanější SNP set pro analýzu PRS u OC obsahuje 36 SNP [81], je podporovaný konsorciem OCAC (*Ovarian Cancer Association Consortium*) a je začleněn do výpočtu absolutního rizika OC spolu s nosičstvím GPV, rodinnou nádorovou anamnézou a osobní klinickopatologickou anamnézou v rámci volně dostupného nástroje pro predikci rizika vzniku karcinomu prsu a ovaria CanRisk [82].

Dalším příkladem studované alternativní dědičnosti u OC může být také dysregulace protinádorové imunity. Konkrétně imunita mediovaná prezentací nádorových neoantigenů, která je geneticky podmíněná nosičstvím určitých HLA (*Human Leukocyte Antigen*) alel či genotypů, byla již v minulosti zkoumána i u OC pacientek [83]. U jiných nádorových onemocnění se v tomto kontextu také popisuje vliv homozygotity v HLA lokusech jako rizikový faktor [84]. OC se také častěji vyskytuje u žen s některými autoimunitními onemocněními, jako je např. lupus erythematodes nebo idiopatická zánětlivá myopatie [85, 86]. Studie imunogenetických predispozic u nádorových onemocnění se tedy jeví do budoucna jako zajímavý směr, který by mohl přispět k pochopení patogeneze onemocnění a zároveň otevřít nové léčebné možnosti např. pomocí imunitních check-point inhibitorů.

1.3.5. Faktory ovlivňující přežití a úspěšnost léčby u nádorů ovaria

Obecně platí, že OC patří mezi gynekologické malignity s nejvyšší mortalitou a nízkou mírou pětiletého přežití (pouze 50 % OC pacientek) [15]. Hlavními faktory ovlivňujícími přežití OC pacientek jsou věk v době diagnózy, stádium v době diagnózy a histologický typ tumoru - lepší přežití mají mladší pacientky [32, 87], pacientky s lokalizovaným onemocněním [15] a pacientky s OC typu I [20]. Dalšími prognostickými faktory jsou také GPV v DNA reparačních genech, zejména v *BRCA1/BRCA2*.

Nosičství GPV ve vysoce a středně penetrantních genech má kromě již výše zmiňovaného zvýšeného rizika vzniku OC vliv i na jeho prognózu. Obecně se uvádí, že OC pacientky s *BRCA1/2* GPV mají lepší prognózu a delší přežití. Tato výhoda ovšem platí převážně v prvních několika letech po diagnóze, pro dlouhodobé přežití (po 6-10 letech dle zvolené studie) už nejsou rozdíly mezi nosičkami a nenosičkami *BRCA1/2* GPV zjevné [88, 89]. Lepší přežití nosiček GPV v genech *BRCA1/2* souvisí s lepší odpovědí na léčbu deriváty platiny a PARP (poly(ADP-ribóza)polymeráza) inhibitory [90, 91]. PARP inhibitory působí na principu syntetické letality nádorových buněk a vykazují nejvyšší benefit pro nosičky GPV v genech *BRCA1/2* a potenciálně pro nosičky GPV v dalších genech zapojených v homologní rekombinaci, jejichž *loss-of-function* mutace vedou k funkčnímu deficitu homologní rekombinace [92, 93].

V souvislosti s léčbou OC se jeví jako potenciální možnost i užití imunitních check-point inhibitorů, jako jsou např. anti-PD-1/PD-L1 nebo anti-CTLA4 molekuly [94]. Při zvažování této léčebné modality by se mělo z hlediska genetického testování uvažovat o provedení HLA typizace, protože bylo zjištěno, že pacienti s různými nádorovými onemocněními v pokročilém stádiu, kteří byli homozygoty v alespoň jednom z HLA lokusů I. třídy, reagovali na tuto léčbu hůře než HLA heterozygoti [95]. Stejně tak nosiči alely HLA-A*03 (ať už v heterozygotním nebo homozygotním stavu) měli při léčbě imunitními check-point inhibitory horší přežití bez progresu i celkové přežití [96]. Tato zjištění, ač dosud nestudovaná přímo u OC, mohou mít v budoucnosti vliv i na léčbu a s ní spojené genetické testování právě i u OC pacientek.

V rámci germinálního genetického testování u pacientek s OC je možné se zaměřit nejen na identifikaci kauzální GPV, ale také na různé polymorfismy, které mohou ovlivňovat reakci na léčbu a přežití. V literatuře je popisována např. pozitivní asociace s dlouhodobým přežitím u OC pacientek, které byly nosičkami rs1800734 v genu *MLH1* či rs2185379 v genu

PRDMI [97, 98], nebo naopak negativní asociace u nosiček rs1001179 v genu *CAT*, rs851797 v genu *EXO1* nebo rs2303428 v genu *MSH2* [87, 97, 99]. Tyto asociace jsou však vysoce populačně specifické a v tomto kontextu by tak měly být i interpretovány.

Vzhledem k vysoké mortalitě OC by měl by být kladen důraz primárně na jeho prevenci. Ač byly provedeny četné studie testující možné populační screeniny OC [100-104], bohužel aktuálně neexistuje takový, který by dokázal s dostatečnou citlivostí odhalit OC v časných stádiích u asymptomatických žen. Proto je vysoce rizikovým pacientkám nabízena chirurgická profylaxe, která významně snižuje riziko vzniku OC a signifikantně prodlužuje délku jejich života [105].

2. Cíle práce

Cílem této disertační práce bylo provést komplexní genetickou analýzu u vysoce rizikových pacientek s gynekologickými tumory se zaměřením na nádory ovaria.

Dílčími cíli práce bylo:

1. charakterizovat hereditární komponenty nádorů ovaria s časným nástupem pomocí celoexomového sekvenování na úrovni DNA a RNA,
2. identifikovat nové germinální patogenní varianty asociované s nádory ovaria pomocí DNA a RNA sekvenování s panelem CZECANCA,
3. popsat asociace nosičství germinálních variant a dalších klinickopatologických charakteristik s přežitím pacientek s nádory ovaria.

Tato disertační práce se tedy souhrnně věnuje charakterizaci genetických faktorů, které způsobují nebo přispívají ke vzniku nádorů ovaria se zaměřením na skupinu mladých pacientek s diagnózou do 30 let věku či které ovlivňují prognózu těchto pacientek. Především hereditární komponenta nádorů ovaria s časným nástupem byla doposud velmi málo prostudovaná a její výsledky mohou přispět k lepšímu porozumění mechanismu vzniku tohoto onemocnění.

3. Metody

3.1. Pacientky a kontroly

V rámci publikací zahrnutých v této disertační práci byly použity různé sady pacientek a kontrol, které jsou blíže popsány v jednotlivých publikacích [106-108]. Všechny pacientky byly diagnostikovány s OC a byly geneticky testovány ve VFN v Praze a na 1. LF UK nebo jiném spolupracujícím pracovišti v rámci CZE CANCA konsorcia [109]. Všechny pacientky i kontroly podepsaly informovaný souhlas s genetickým testováním, jež byl schválen etickou komisí. Data všech účastníků byla anonymizována a jsou dostupná v uvedených publikacích, jejich doplňujících souborech nebo na vyžádání u korespondenčního autora.

3.2. Metody

3.2.1. Příprava DNA a RNA sekvenační knihovny

Příprava sekvenačních knihoven byla provedena dle instrukcí od výrobce s drobnými úpravami popsanými v dřívějších publikacích [110-113]. Pro přípravu sekvenační DNA knihovny použito 200-800 ng genomové DNA izolované z leukocytů periferní krve. DNA byla fragmentována (enzymaticky či ultrazvukem) na fragmenty s průměrnou délkou cca 200 bp a dále zpracována pomocí kitů KAPA HyperPrep Kit, KAPA HyperPlus Kit nebo KAPA EvoPlus Kit (Roche). Pro přípravu sekvenační RNA knihovny bylo použito 5 µl RNA izolované z leukocytů periferní krve bez ohledu na její koncentraci. RNA byla fragmentována na fragmenty s průměrnou délkou cca 180-200 bp a příprava RNA knihovny byla provedena pomocí KAPA RNA HyperPrep Kit (Roche).

Následně bylo 6-96 pre-knihoven jednotlivých vzorků ekvimolárně smícháno tak, aby celkové množství DNA bylo 1,5-2 µg. Dále byla provedena hybridizace se sondami dle volby experimentu - KAPA HyperExome panel, na míru objednanými KAPA HyperChoice panely CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) [110] a/nebo PRSman (Roche) [76]. Pro hybridizaci a následné omytí byl použit KAPA HyperCapture Reagent Kit (Roche). Sekvenování finálních knihoven bylo provedeno na sekvenátoru NextSeq 500 (2× 76 cyklů), NextSeq 2000 (2× 151 cyklů) nebo NovaSeq 6000 (2× 101 cyklů; Illumina).

3.2.2. Bioinformatické a statistické zpracování dat

Získaná hrubá sekvenační data byla zpracována pomocí vlastního bioinformatického postupu a identifikované varianty byly následně prioritizovány a filtrovány. Ve zkratce byly odfiltrovány varianty s nízkou sekvenační kvalitou, lokalizované v repetitivních a nekódujících oblastech, frekventní u kontrol a v populačních databázích, klasifikované v databázi ClinVar jako benigní/pravděpodobně benigní nebo po vizuální inspekci vyhodnoceny jako sekvenační chyby. Následně byly zbylé varianty prioritizovány a jako patogenní/pravděpodobně patogenní varianty byly klasifikovány varianty vedoucí k předčasnému zařazení stop kodonu, porušení start kodonu a porušení čtecího rámce, varianty lokalizované v rámci konsensního sestřihového místa (+-1/2 bp od hranice exonu) nebo varianty ovlivňující sestřih dle predikčních nástrojů a RNA analýzy. Velké přestavby (*Copy Number Variation*, CNV) byly hodnoceny na základě normalizovaného CNV skóre získaného pomocí CNV kit analýzy. Konkrétní filtrační kritéria jsou uvedena v daných v publikacích včetně verzí využívaných nástrojů a filtračních kritérií [106, 108, 110-113].

Výpočet PRS je uveden v publikaci [76]. HLA typizace byla provedena z DNA celoexomových dat s využitím nástroje spechLA v defaultním nastavení [114]. *Overrepresentation* analýza byla provedena pomocí online nástroje WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit [115]. Statistická analýza a analýza přežití byla provedena v programu R v4.2.0 [116], přičemž za statisticky signifikantní byly považovány *p* hodnoty nižší než 0,05. Pro analýzu přežití byl použit R balíček *survival* [117].

3.2.3. HRMA

Metoda HRMA (*High-Resolution Melting Analysis*) byla provedena pro genotypizaci polymorfismu rs2185379 [107]. Pro analýzu byly použity *in-house* navržené primery: *forward* 5'-GTGGACAGAGGCTGAGTTTGA-3' a *reverse* 5'-TCACTGTTGGTGGCATACTTGA-3'. HRMA byla provedena v reakčním objemu 6 µl s využitím 5× HOT FIREPol EvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne) na stroji LightCycler 480 II System (Roche) pomocí programu: 1. iniciální denaturace 95 °C po dobu 12 min; 2. 50 cyklů PCR - 95 °C po dobu 15 sec, 60 °C po dobu 25 sec, 72 °C po dobu 15 sec; 3. analýza křivek tání - denaturace při 95 °C po dobu 5 sec, renaturace při 72 °C po dobu 1 sec, a následná detekce tání až do 95 °C s měřením čtyřikrát za každý jeden °C. Analýza dat byla provedena pomocí LightCycler 480 Software (v1.5.0 SP4) s využitím *Gene Scanning analysis*. Každý analytický běh obsahoval pozitivní a negativní kontrolu.

3.2.4. Konfirmace nalezených variant

Malé strukturní varianty (SNP nebo malé inserce či delece) byly konfirmovány pomocí Sangerova sekvenování nebo RNA analýzy. Přítomnost velkých přestaveb byla konfirmována pomocí MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) nebo RNA analýzy. Suspektní RNA události nejasného významu byly konfirmovány pomocí reverzní transkripce, PCR a Sangerova sekvenování, jak je detailně uvedeno v konkrétních publikacích. Sangerovo sekvenování a MLPA byly provedeny na přístroji ABI 3500 (Applied Biosystems).

4. Výsledky

Všechny pacientky s OC jsou v ČR indikovány ke genetickému testování nádorové predispozice pouze na základě diagnózy OC bez dalších podmínek. Nad rámec rutinní diagnostiky se v rámci klinického výzkumu zkoumají další možné příčiny vzniku tohoto nádorového onemocnění, jako je např. asociace kandidátních genů s onemocněním, rozšířená analýza nových variant v již známých nádorových predispozičních genech, vliv nízké penetrantnosti alel nebo identifikace alternativních genetických mechanismů zapojených v nádorové predispozici.

Tato disertační práce kompiluje výsledky tří primárních publikací a jednoho rešeršního článku, které se věnují genetickému testování u pacientek s OC v ČR a zaměřují se především na:

1. komplexní charakterizaci hereditární komponenty OC s časným nástupem vč. charakterizace nových germinálních patogenních variant [27, 106, 108];
2. asociaci nosičství germinálních variant a dalších klinickopatologických charakteristik s přežitím pacientek s OC [106, 107].

Uvedené publikační výstupy navazují na již dříve provedené studie genetické nádorové predispozice u pacientek s OC v ČR [22, 118] a prohlubují poznání v tomto odvětví. Zásadním rozdílem publikací zahrnutých v této disertační práci je rozšíření metodického přístupu, začlenění nejen DNA, ale i RNA analýzy; rozšíření spektra analyzovaných genů nad rámec panelu CZECANCA (226 etablovaných a kandidátních nádorových predispozičních genů) až na úroveň celoexomového sekvenování; a zařazení genetických analýz dalších způsobů dědičnosti jako je PRS, germinální mutační zátěž a HLA typizace. Z dostupných klinických dat byly dále provedeny i analýzy přežití pacientek, které byly korelovány s nalezenými genetickými alteracemi a dostupnou histologií, osobní a rodinnou anamnézou.

4.1. Komplexní charakterizaci hereditární komponenty nádorů ovaria s časným nástupem vč. charakterizace nových GPV

Problematika nejasné genetické predispozice u specifické skupiny pacientek s OC s časným nástupem (<30 let) byla nejprve teoreticky shrnuta v podobě literárního přehledu [27] a následně experimentálně testována a zpracována do podoby výsledkového článku [106]. V rámci RNA analýzy byla mj. nalezena nová hluboká sestřihová GPV c.1009-118_1009-87delinsC v genu *CHEK2*, která byla detailně charakterizována v rámci druhého výsledkového článku [108]:

Horackova, K., Janatova, M., Kleiblova, P., Kleibl, Z. & Soukupova, J. 2023. **Early-Onset Ovarian Cancer <30 Years: What Do We Know about Its Genetic Predisposition?** *Int J Mol Sci*, 24, 17020. IF₂₀₂₃ = 4,9 (viz Příloha 1)

Autorský podíl: literární rešerše a příprava manuskriptu.

Horackova, K., Zemankova, P., Nehasil, P., Vocka, M., Hovhannisyan, M., Matejkova, K., Janatova, M., Cerna, M., Kleiblova, P., Jelinkova, S., Stastna, B., Just, P., Dolezalova, T., Nemcova, B., Urbanova, M., Koudova, M., Hazova, J., Machackova, E., Foretova, L., Stranecky, V., Zikan, M., Kleibl, Z. & Soukupova, J. 2024. **A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer.** *Sci Rep*, 14, 16183. IF₂₀₂₃ = 3,8 (viz Příloha 2)

Autorský podíl: příprava sekvenačních DNA i RNA knihoven a provedení NGS, analýza a interpretace dat, konfirmace nalezených variant, příprava manuskriptu.

Zemankova, P., Cerna, M., **Horackova, K.**, Ernst, C., Soukupova, J., Borecka, M., Blumcke, B., Cerna, L., Cerna, M., Curtisova, V., Dolezalova, T., Duskova, P., Dvorakova, L., Foretova, L., Havranek, O., Hauke, J., Hahnen, E., Hodulova, M., Hovhannisyan, M., Hruskova, L., Janatova, M., Janikova, M., Jelinkova, S., Just, P., Kosarova, M., Koudova, M., Krutilkova, V., Machackova, E., Matejkova, K., Michalovska, R., Misove, A., Nehasil, P., Nemcova, B., Novotny, J., Panczak, A., Pesek, P., Scheinost, O., Springer, D., Stastna, B., Stranecky, V., Subrt, I., Tavandzis, S., Tureckova, E., Vesela, K., Vlckova, Z., Vocka, M., Wappenschmidt, B., Zima, T., Kleibl, Z. & Kleiblova, P. 2024. **A deep intronic recurrent *CHEK2* variant c.1009-118_1009-87delinsC affects pre-mRNA splicing and contributes to hereditary breast cancer predisposition.** *Breast*, 75, 103721. IF₂₀₂₃ = 5,7 (viz Příloha 3)

Autorský podíl: funkční charakterizace sestřihové události, editování manuskriptu.

Nádory ovaria diagnostikované <30 let, tzv. s časným nástupem, jsou specifickou skupinou odlišující se v několika zásadních parametrech od ostatních OC s pozdním nástupem (viz **Tabulka 1**). Zásadním rozdílem z hlediska nádorové predispozice je atypicky nízké zastoupení nosiček GPV ve známých OC predispozičních genech, a to i u pacientek s epiteliálním OC. Ve skupině 123 pacientek diagnostikovaných s OC <30 let jsme provedli celoexomové sekvenování, a to jak na úrovni DNA, tak i RNA, které bylo dále doplněno o další analýzy jako je PRS, germinální mutační zátěž a HLA typizace. Výsledky byly statisticky porovnávány vůči setu populačně specifických, zdravých nenádorových kontrol a patientských kontrol s pozdním nástupem OC s odpovídajícím histologickým typem a stádiem onemocnění.

Pomocí komplexní genetické analýzy jsme navrhli dvě možné, dosud nepopsané trajektorie genetické predispozice k OC s časným nástupem:

1. genetická nádorová predispozice podobná FBC podpořená:

- zvýšenou frekvencí GPV v genu *CHEK2*, jehož GPV jsou asociované se středním rizikem vzniku FBC, avšak dosud ne s OC;
- stratifikací pacientek s OC s časným nástupem s využitím PRS₃₁₃, tj. SNP setu designovaném pro stratifikaci rizika vzniku FBC;
- *overrepresentation* analýza, která prokázala signifikantní nabohacení GPV v setu genů asociovaných s karcinomem prsu.

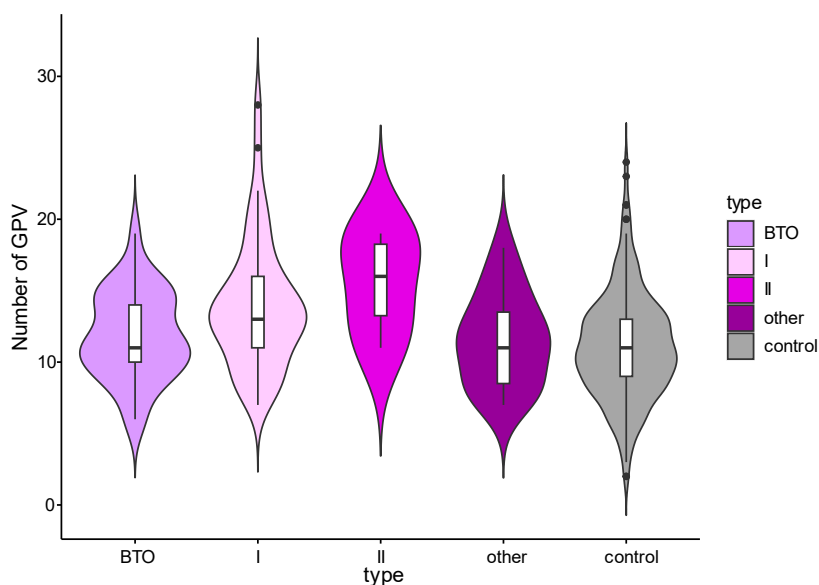
2. imunogenetická predispozice ovlivňující protinádorovou imunitu podpořená:

- zvýšenou frekvenci GPV v genu *LY75-CD302*, jehož produkt je mj. zapojen v prezentaci neoantigenů;
- zvýšenou frekvencí nosičů určitých HLA alel, především DRB1*11:01;
- zvýšenou frekvencí homozygotů v alespoň třech z osmi testovaných HLA lokusech;
- zvýšenou celkovou germinální mutační zátěží pacientek.

4.1.1. Analýza germinálních patogenních variant

V rámci analýzy DNA/RNA celoexomových dat [106] bylo prioritizováno a následně klasifikováno jako GPV celkem 1563 variant (z toho 1506 unikátních variant) v 1390 genech. Medián počtu GPV u pacientek dosahoval 13 (rozptyl 2-28), zatímco u nenádorových kontrol 11 (rozptyl 1-24). Germinální mutační zátěž vykazovala rostoucí trend ve směru od pacientek s neepiteliálními OC, k pacientkám s *borderline* tumory a dále k pacientkám s OC typu I a II (nejvyšší) ($p=3,8\times 10^{-4}$) (**Obr. 1**). Na základě úrovně germinální mutační zátěže bylo možné rozdělit pacientky a kontroly do tří skupin, a to s nízkou zátěží ≤ 10 GPV (34/123 pacientek vs. 106/227 kontrol; $p=0,0006$), se střední zátěží v rozsahu 11-14 GPV (54/123 pacientek vs. 87/227 kontrol $p=0,361$) a s vysokou zátěží ≥ 15 (35/123 pacientek vs. 34/227 kontrol; $p=0,003$).

Obr. 1: Germinální mutační zátěž u pacientek s OC s časným nástupem vs. nenádorové kontroly. Pacientky byly dle histologického typu OC rozděleny do čtyř kategorií: BTO (*borderline* tumory ovaria), typ I (epiteliální OC *low-grade* serózní, serózní grade neznámý, mucinózní, endometroidní, světlobuněčný), typ II (epiteliální OC *high-grade* serózní) a *other* (neepiteliální OC).



BTO, *borderline* tumory ovaria; GPV, germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianta.

U 1563 prioritizovaných GPV jsme provedli *overrepresentation* analýzu, která ukázala signifikantní nabohacení GPV v genech asociovaných s karcinomem prsu (#114,480: *Breast cancer*; disease in OMIM; $p=4,5\times 10^{-10}$; FDR 3×10^{-9}) a dále s primárním peritoneálním karcinomem (#HP:0,030,406 *Primary peritoneal carcinoma*; phenotype in Human Phenotype Ontology; $p=6,7\times 10^{-6}$; FDR 0,011).

Záchytnost GPV v HBOPC predispozičních genech byla 13,8 % (17/123; **Tabulka 3**), avšak pouze 2/123 pacientky byly nosičkami GPV v *BRCA1/2*. Pokud se zaměříme pouze na OC predispoziční geny, byla záchytnost GPV 4,9 % (6/123). Přítomnost GPV v OC predispozičních genech signifikantně korelovala s výskytem nádorových duplicit v osobní anamnéze pacientek ($p=0,016$). Je zajímavé, že v našem souboru pacientek jsme zachytili více nosiček GPV v OC predispozičních genech mezi pacientkami s neepiteliálními tumory (5/15; 33,3 %) než u pacientek s invazivním epiteliálním OC (4/61; 6,6 %; $p=0,012$). V souboru námi vyšetřovaných pacientek jsme nenalezli žádnou GPV v genech asociovaných typicky s neepiteliálními tumory.

Tabulka 3: Germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianty (GPV) v HBOPC predispozičních genech identifikované u OC pacientek s časným nástupem. OC geny a p hodnoty $<0,05$ jsou zvýrazněny tučně.

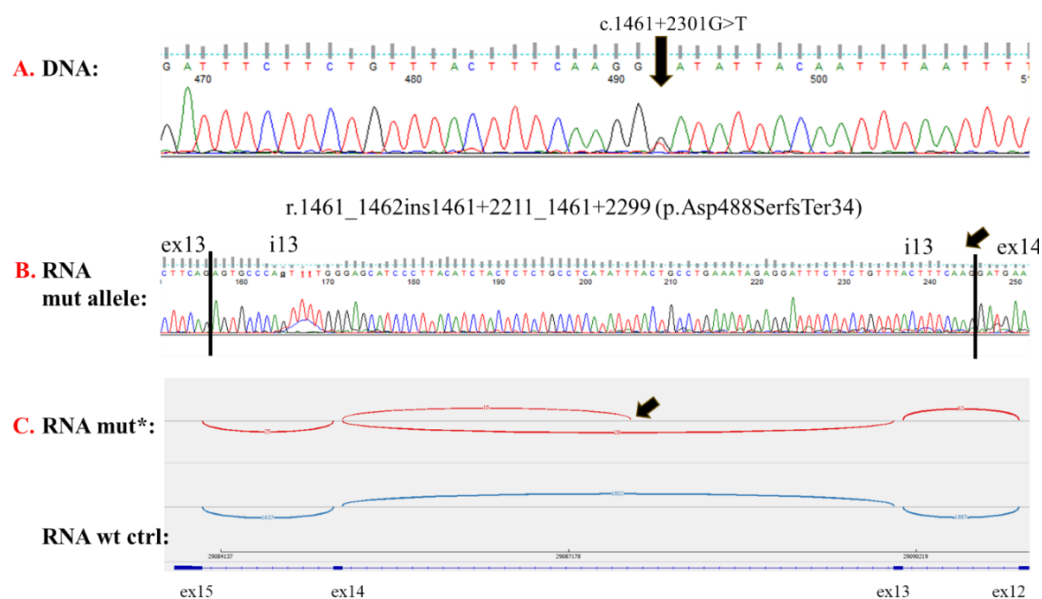
Gen	Počet OC pac. <30 let N=123 (%)	Počet OC pac. >30 let [22]* N=1320 (%)	p hodnota
<i>ATM</i>	2 (1,6)	6 (0,5)	0,14
<i>BARD1</i>	2 (1,6)	3 (0,2)	0,06
<i>BRCA1</i>	1 (0,8)	229 (17,4)	$8,5\times 10^{-9}$
<i>BRCA2</i>	1 (0,8)	94 (7,1)	0,003
<i>BRIPI</i>**	1 (0,8)	10 (0,8)	1
<i>CHEK2</i>	6 (4,9)	12 (0,9)***	0,002
<i>MLH1</i>	0	4 (0,3)	1
<i>MSH2</i>	1 (0,8)	3 (0,2)	0,3
<i>MSH6</i>	0	3 (0,2)	1
<i>PALB2</i>	0	8 (0,6)	1
<i>PMS2</i>	1 (0,8)	NA	NA
<i>RAD51C</i>	2 (1,6)	13 (1)	0,37
<i>RAD51D</i>	0	13 (1)	0,62
<i>TP53</i>**	1 (0,8)	1 (0,1)	0,16
Suma	17 (13,8)	399 (30,2)	$6,6\times 10^{-5}$

*nosičky více než jedné GPV (N=13) byly z analýzy vyřazeny; **jedna pacientka byla zároveň nosičkou GPV v genu *BRIPI* a *TP53*; ***jedna GPV byla identifikována při opakované analýze. GPV, germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianta; HBOPC, syndrom hereditárního karcinomu prsu, ovarií a pankreatu.

Nejčastěji alterovaným nádorovým predispozičním genem byl *CHEK2* (Tabulka 3), který je asociován se středním rizikem vzniku FBC [10]. GPV v *CHEK2* jsme identifikovali u 6/123 (4,9 %) a tato frekvence byla signifikantně vyšší než u nenádorových kontrol (0/378, $p=1,2 \times 10^{-4}$). Věk v době diagnózy OC byl u nosiček GPV v *CHEK2* významně nižší než u pacientek bez GPV v HBOPC genech, žádný z histologických typů však mezi *CHEK2* nosičkami nepřevládal.

Identifikovali jsme dvě rekurentní varianty c.1100del a delecii exonů 9-10 (každá u dvou pacientek). Další dvě z identifikovaných GPV byly nalezeny na základě integrované RNA-NGS analýzy a jednalo se o hluboké intronové varianty, c.1461+2301G>T a c.1009-118_1009-87delinsC. Tyto intronové varianty byly původně klasifikovány jako VUS s neznámým vlivem na sestřih pre-mRNA. Jejich charakterizaci na úrovni mRNA jsme provedli nejen pomocí RNA-NGS, ale také pomocí reverzní transkripce, PCR a Sangerova sekvenování.

Obr. 2: Charakterizace nové intronové varianty *CHEK2*:c.1461+2301G>T a jejího dopadu na sestřih: **A.** na úrovni DNA – varianta je označena šipkou; **B.** na úrovni RNA - charakterizace pomocí reverzní transkripce a Sangerova sekvenování s využitím reverzního primeru specifického pro mutovanou alelu; **C.** vizualizace sestřihové události u pacientky-nosičky mutované alely a u kontroly-nenosičky (*wt ctrl*) pomocí RNA-NGS – identifikovaný 3' konec je označen šipkou. *Sestřihová událost byla přítomna ve 26% frakci RNA-NGS dat u vzorku RNA z periferní krve bez inhibice *nonsense-mediated decay*.



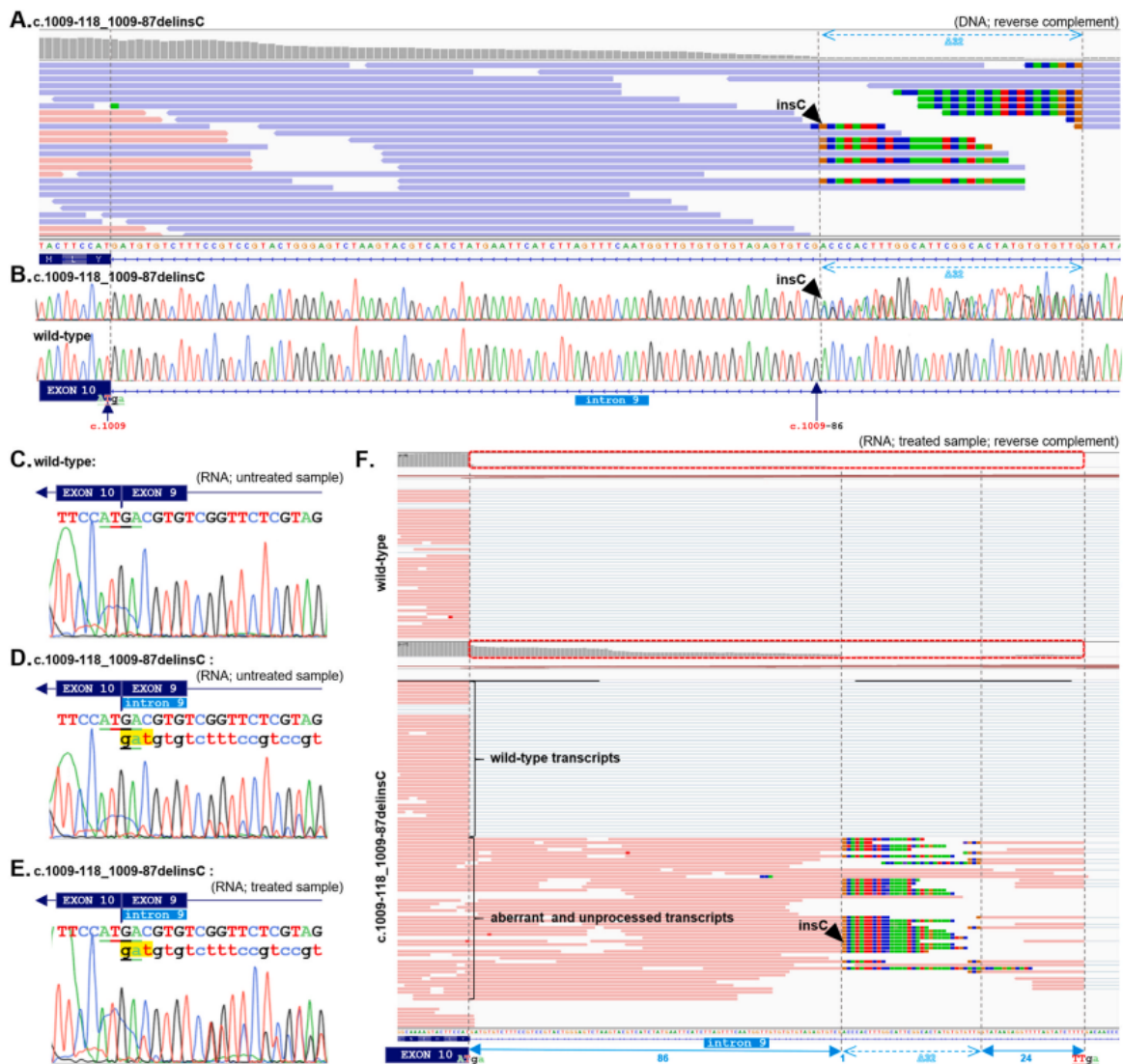
Ctrl, kontrola; ex, exon; i, intron; mut, mutovaná alela; wt, *wildtype* alela.

Nalezená alterace c.1461+2301G>T byla v databázi ClinVar klasifikována jako VUS, a to kvůli predikované *in-frame* exonizaci intronu. Nicméně naše analýzy potvrdily využití alternativního sestřihového místa s *out-frame* exonizací 89 bp (r.1461_1462ins1461+2211_1461+2299) a na úrovni proteinu s předpokládaným zařazení předčasného terminačního kodonu p.(Asp488SerfsTer34) (**Obr. 2**). U uvedené pacientky s OC s časným nástupem byla sestřihová událost v RNA-NGS data přítomna ve 26% frakci [106]. V rámci databáze CZECANCA jsme identifikovali ještě jednu další nosičku této varianty, která byla diagnostikována s FBC a karcinomem děložního hrdla.

Druhá nová sestřihová varianta c.1009-118_1009-87delinsC je na úrovni DNA tvořena delecí 32 bp spolu s inzercí cytosinu, což vede k využití alternativního sestřihového místa na pozici c.1009-142, retenci části intronu 9 (r.1008_1009ins1009-142_1009-1del1009-118_1009-87insC) a na úrovni proteinu k předpokládanému zařazení předčasného terminačního kodonu p.(Tyr337PhefsTer37) (**Obr. 3**). Frakce této sestřihové události se mezi analyzovanými pacientkami pohybovala v rozmezí 7-26 %. Z tohoto důvodu jsme analýzu doplnili ještě o esej s inhibicí NMD (*Nonsense-Mediated Decay*), který prokázal nabohacení frakce sestřihové události až na 46 %. Tato varianta je rekurentní a kromě jedné pacientky s OC s časným nástupem [106] byla v rámci databáze CZECANCA nalezena ještě u dalších čtyř pacientek s OC (celkem OC 5/2966; 0,17 %) a 21/10204 (0,21 %) pacientek s FBC, zatímco v populačně specifických neselektovaných kontrolách byla přítomna pouze 1/3250 (0,03 %). Varianta byla statisticky signifikantně nabohacená u pacientek s FBC ($p=0,04$), ale ne u OC vzhledem k malému počtu nosiček ($p=0,11$) [108]. Analýza sestřihových variant mimo konsenzní sestřihová místa ve vysoce a středně penetrantních genech se nicméně jeví důležitá pro rozšíření znalosti o genetické nádorové predispozici.

Dalším nejčastěji alterovaným genem (4,9 %; 6/123) byl gen *LY75-CD302*, jehož proteinové produkty jsou zapojeny v prezentaci antigenů v rámci imunitní odpovědi. I v případě *LY75-CD302* byla frekvence GPV signifikantně vyšší u pacientek než u nenádorových kontrol (1/378, $p=8,3 \times 10^{-4}$). Nicméně nosičky GPV v tomto genu se od zbytku souboru neodlišovaly žádnou klinickopatologickou charakteristikou kromě pozitivní nádorové rodinné anamnézy ve všech šesti případech.

Obr. 3: Charakterizace nové intronové varianty *CHEK2*: c.1009-118_1009-87delinsC a jejího dopadu na sestřih: **A.-B.** na úrovni DNA analyzováno DNA-NGS (A) a reverzní transkripcí a Sangerovým sekvenováním ve srovnání s kontrolou-nosičem varianty (B) – varianta je označena modrou šrafovanou (delece 32 bp) a černou (insece C) šipkou; **C-E.** na úrovni RNA analyzováno reverzní transkripcí a Sangerovým sekvenováním u kontroly-nosiče (C), nosičky varianty bez inhibice *nonsense-mediated decay* (D) a s inhibicí *nonsense-mediated decay* (E); **F.** na úrovni RNA analyzováno RNA-NGS u kontroly-nosiče a nosičky varianty s inhibicí *nonsense-mediated decay*.

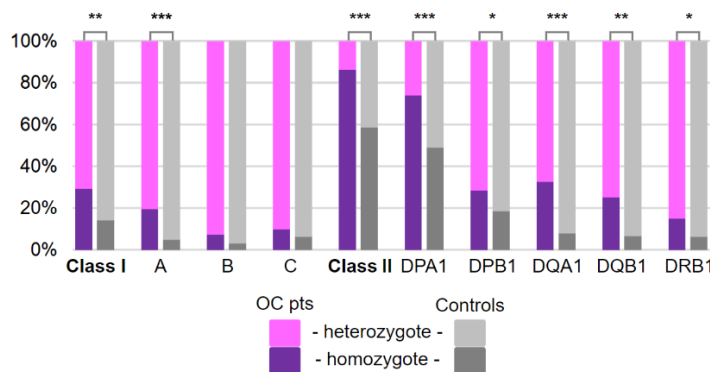


4.1.2. HLA typizace

Z DNA celoexomových dat [106] byla provedena HLA typizace 8 dostupných lokusů I. (HLA-A, B, C) a II. třídy (DPA1, DPB1, DQA1, DQB1 a DRB1) následovaná analýzou nabohacení konkrétních alel a stanovením zygotity. Analýza nabohacení konkrétních HLA alel odhalila u pacientek pět signifikantně odlišných frekvencí alel (dvě z HLA I. třídy a tři z HLA II. třídy). Jednalo se o HLA-A*36:01 a HLA-B*53:01, které jsou poměrně raritní u pacientek a prakticky se nevyskytovaly u kontrol. Dále byly identifikovány dvě alely v lokusu II. třídy DQA1, z nichž DQA1*01:03 byla vyhodnocena jako riziková, zatímco DQA1*03:03 se jevila jako protektivní. Největší rozdíl jsme pozorovali u alely DRB1*11:01, jejíž frekvence u pacientek byla 11,6 % vs. 5,1 % ($p=0,003$) u nenádorových kontrol >60 let, a u které bylo OR vyčísleno na 2,40 (95%CI: 1,32-4,57). Na úrovni počtu nosiček této alely se jednalo o 24/123 pacientek (19,5 %; čtyři v homozygotním stavu) vs. 22/227 kontrol (9,7 %; jedna v homozygotním stavu; $p=0,013$).

Dále jsme hodnotili homozygotitu v 8 uvedených testovaných lokusech. Pacientky byly signifikantně častěji nosičkami alespoň jedné homozygotní alely v porovnání s nenádorovými kontrolami (108/123 vs. 142/227; $p=3\times 10^{-7}$). Při detailnější analýze se ukázala jako významná hranice nosičství třech a více homozygotních lokusů z osmi testovaných (44/123 vs. 15/227; $p=5\times 10^{-9}$), pro kterou bylo OR 7,87 (95%CI: 4,16-14,91). Statisticky signifikantně se lišily frekvence nosičů homozygotních alel souhrnně u HLA I. i II. třídy, při rozboru jednotlivých lokusů byl signifikantní rozdíl patrný také samostatně u lokusu HLA-A, DPA1, DPB1, DQA1, DQB1 a DRB1 (**Obr. 4**).

Obr. 4: Frekvence homozygotů v HLA lokusech u 123 pacientek s OC s časným nástupem ve srovnání s kontrolami.



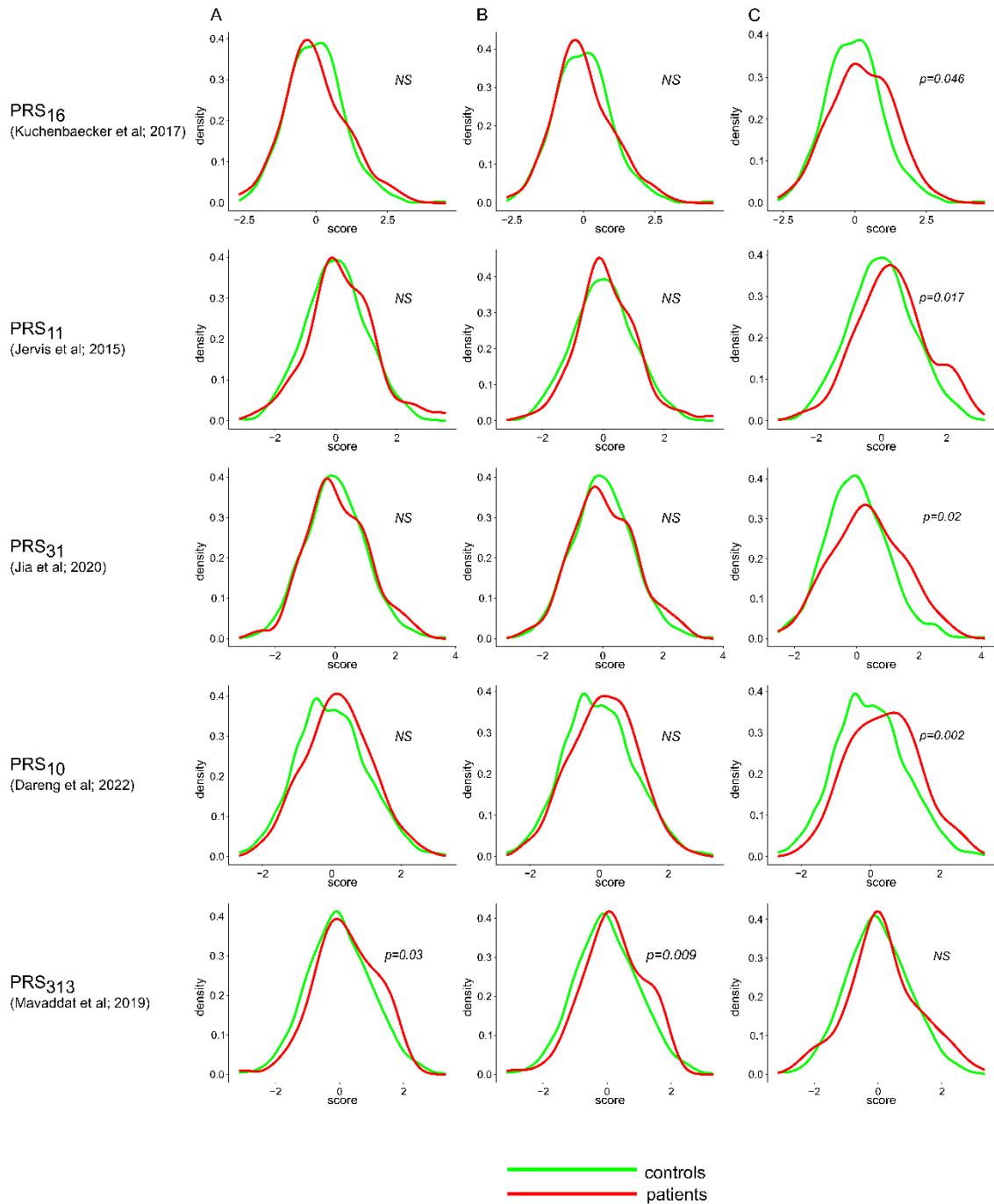
* $p<0.05$; ** $p<0.001$; *** $p<10^{-5}$. HLA, lidské leukocytární antigeny; OC pts, pacientky s nádory ovaria.

4.1.3. Analýza PRS

Pomocí námi navrženého panelu PRSman jsme u každé pacientky vyšetřili 844 SNP [76] včetně SNP obsažených v 11 různých publikovaných SNP setech, přičemž deset z nich bylo navržených pro stratifikaci rizika vzniku OC a jeden pro FBC. Na základě PRS vypočítaného z uvedených dat nicméně nebylo možné s pomocí ani jednoho z deseti OC specifických SNP setů stratifikovat OC pacientky s časným nástupem [106] ani od kontrolní skupiny pacientek s pozdním nástupem a odpovídající histologií a stádiem onemocnění, ani od zdravých neselektovaných populačně specifických kontrol (**Obr. 5**). S ohledem na to, že OC SNP sety jsou většinou cíleny na pacientky s HGSC, který byl ve skupině pacientek s časným nástupem ojedinělý (pouze 2/123; 1,6 %), využili jsme u jednoho SNP setu [79] s dostupnými informacemi také možnost výpočtu PRS z rizik pro specifické histologické typy - LGSC a mucinózní OC. Nicméně ani tento upravený výpočet neměl dostatečnou diskriminační schopnost pro rozlišení OC pacientek s danou histologií od kontrol.

Na druhou stranu ale bylo možné stratifikovat OC pacientky s časným nástupem od kontrol pomocí PRS vypočítaného ze SNP setu obsahujícího 313 SNP [106] vybraných pro stratifikaci rizika vzniku FBC ($p=0,03$). Tyto výsledky naznačují možné propojení OC s časným nástupem s polygenní genetickou predispozicí FBC. Jelikož však měl SNP set PRS₃₁₃ stejnou diskriminační schopnost i pro OC pacientky s časným i pozdním nástupem a odpovídající histologií a stádiem onemocnění ($p=0,009$; **Obr. 5**), můžeme spíše spekulovat o propojení predispozice FBC a OC typu I či jiných histologických typů kromě HGSC. Naopak čtyři OC specifické SNP sety [73, 77, 78, 81] se ukázaly jako stratifikující pro HGSC pacientky s pozdním nástupem (bez detekovaných GPV v OC genech) od kontrol, což dále podporuje genetickou odlišnost jednotlivých histologických typů OC.

Obř. 5: Srovnání distribuce PRS u OC pacientek s řasným nástupem (A), řasným i pozdním nástupem a odpovídající histologií a stádiem onemocnění (B) a pacientek s pozdním nástupem HGSC (C) vs. u kontrol. Zobřazeny jsou pouze SNP sety, které byly schopné stratifikovat alespoň jednu skupinu pacientek od kontrol. Číslo uvedené v názvu SNP setu (PRS_{xx}) odpovídá počtu SNP zahrnutých do daného setu.



PRS, skóre polygenního rizika; NS, nesignifikantní.

4.1.4. Integrovaná genetická analýza

Budeme-li souhrnně hodnotit výsledky genetické analýzy - přítomnosti GPV v HBOPC predispozičních genech, PRS, germinální mutační zátěž, HLA homozygotitu a nosičství alely HLA-DRB1*11:01; nelze kvůli malé velikosti podsouborů žádnou skupinu pacientek signifikantně odlišit. Nicméně lze sledovat trend určité výlučnosti některých parametrů (**Obr. 6**). V rámci testované skupiny 123 pacientek s OC s časným nástupem (<30 let) lze pacientky na základě komplexní genetické analýzy rozdělit do čtyř hlavních podskupin:

- a) nosičky GPV v HBOPC genech,
- b) vysoce rizikové pacientky stratifikované pomocí PRS₃₁₃,
- c) pacientky s vysokou germinální mutační zátěží,
- d) HLA homozygotky.

Celkem 43 pacientek (43/123; 35,0 %) vykazovalo všechny čtyři výše uvedené genetické parametry negativní.

Nosičky GPV v HBOPC genech (17/123; 13,8 %) nejsou až na výjimku jedné pacientky (1/123; 0,8 %) zároveň stratifikovány jako vysoce rizikové, tj. v horním decilu (N=11), dle PRS₃₁₃. Sedm pacientek (7/123; 5,7 %) s vysokou germinální mutační zátěží (≥ 15 GPV; N=35) a tři HLA homozygotky (3/123; 2,4 %) ve třech a více testovaných lokusech (N=44) bylo zároveň nosičkami GPV v HBOPC genu. Nosičství HBOPC GPV se tedy jeví jako samostatný predispoziční faktor, ač u skupiny pacientek s OC s časným nástupem tvoří tato skupina malou frakci v porovnání s klasickým OC s pozdním nástupem.

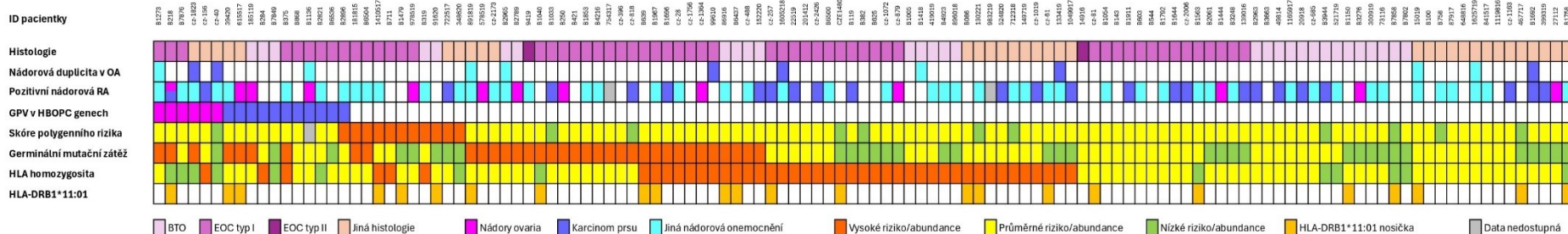
Naopak 11 pacientek (11/123; 8,9 %) mělo zároveň vysokou germinální mutační zátěž (N=35) a bylo HLA homozygotní ve třech a více testovaných lokusech (N=44). Stejně tak ale 11 pacientek (11/123; 8,9 %) bylo HLA homozygotní a zároveň mělo nízkou germinální mutační zátěž (≤ 10 GPV; N=34). HLA homozygotita se tedy jeví jako genetický faktor, který by společně s úrovní germinální mutační zátěže mohl rozdělit pacientky do podskupin, které by mohly být prognosticky důležité pro léčbu imunitními check-point inhibitory. Tyto výsledky je však nutné rozšířit o analýzu na větším souboru pro stanovení jejich signifikance.

Nosičky signifikantně nabohacené HLA alely HLA-DRB1*11:01 (N=24) nesly v devíti případech (9/123; 7,3 %) vysokou germinální mutační zátěž (N=35) a v deseti případech (10/123; 8,1 %) byly HLA homozygotkami (N=44). Dále byly nosičky HLA-

DRB1*11:01 (N=24) ve třech případech (3/123; 2,4 %) stratifikovány jako vysoce rizikové dle PRS₃₁₃ (N=11), stejně jako tři (3/123; 2,4 %) HLA homozygotky (N=44). Jedna pacientka byla zároveň nosičkou HLA-DRB1*11:01 i HLA homozygotních lokusů. Celkem tedy pět pacientek (5/123; 4,1 %) bylo stratifikováno jako vysoce rizikové na základě PRS₃₁₃ (N=11) a zároveň neslo HLA signifikantně nebohacený parametr v našem souboru. HLA-DRB1*11:01 a HLA homozygotní status se tedy jeví jako potenciální kandidátní parametr pro začlenění do stále se vyvíjejících SNP setů pro výpočet PRS u OC či HBOPC pacientek.

Výsledky naznačují, že i v rámci tak specifické skupiny pacientek jako jsou OC s časným nástupem existuje heterogenita jejich hereditárních predispozic a pro lepší pochopení tohoto onemocnění je potřeba ve výzkumu pokračovat na větším souboru pacientek.

Obr. 6: Klinickopatologické charakteristiky a výsledky integrované genetické analýzy u 123 pacientek s OC s časným nástupem (N=123). **Histologické typy** byly pro větší přehlednost rozděleny do čtyř kategorií: BTO (*borderline* tumory ovaria), EOC typ I (epiteliální OC *low-grade* serózní, serózní grade neznámý, mucinózní, endometroidní, světlobuněčné), EOC typ II (epiteliální OC *high-grade* serózní) a jiné histologické typy. **Osobní a rodinná nádorová anamnéza** byla rozdělena do tří hlavních kategorií: nádory ovaria, karcinom prsu a jiná nádorová onemocnění. **GPV v HBOPC genech** byly rozděleny na geny asociované přímo s OC a další geny asociované obecně s HBOPC, primárně karcinomem prsu, dle NCCN [10]. Dle **skóre polygenního rizika** (PRS) byly pacientky rozděleny na vysoce rizikové (desátý decil PRS₃₁₃), s průměrným rizikem (druhý až devátý decil PRS₃₁₃) nebo nízkorizikové (první decil PRS₃₁₃). Dle **germinální mutační zátěže** byly pacientky rozděleny na ty s vysokou (≥ 15 GPV), průměrnou (11-14) a nízkou abundancí GPV (≤ 10 GPV). Dle **HLA homozygotity** byly pacientky rozděleny na ty s vysokou abundancí homozygotních lokusů (ve třech a více testovaných lokusech z osmi), průměrnou (jeden či dva homozygotní lokusy) a nízkou abundancí (heterozygotní ve všech osmi testovaných lokusech). Dle **HLA-DRB1*11:01** byly pacientky rozděleny na nosičky a nenosičky této alely.



BTO, *borderline* tumory ovaria; EOC, epiteliální nádor ovaria; GPV, germinální patogenní/pravděpodobně patogenní varianta; HBOPC, syndrom hereditárního karcinomu prsu, ovarii a pankreatu; HLA, lidské leukocytární antigeny; OC, nádory ovaria; OA, osobní anamnéza; OC, nádory ovaria; PRS, skóre polygenního rizika; RA, rodinná anamnéza.

4.2. Asociace germinálních variant a dalších klinickopatologických charakteristik s přežitím u pacientek s nádory ovaria

Zhodnocení prognostických faktorů genetické i negenetické povahy u pacientek s nádory ovaria bylo součástí dvou původních publikací, v nichž se patientské soubory částečně překrývají:

Horackova, K., Zemankova, P., Nehasil, P., Vocka, M., Hovhannisyán, M., Matejkova, K., Janatova, M., Cerna, M., Kleiblova, P., Jelinkova, S., Stastna, B., Just, P., Dolezalova, T., Nemcova, B., Urbanova, M., Koudova, M., Hazova, J., Machackova, E., Foretova, L., Stranecky, V., Zikan, M., Kleibl, Z. & Soukupova, J. 2024. **A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer.** *Sci Rep*, 14, 16183. IF₂₀₂₃ = 3,8 (viz Příloha 2)

Autorský podíl: příprava sekvenačních DNA i RNA knihoven a provedení NGS, analýza a interpretace dat, konfirmace nalezených variant, příprava manuskriptu.

Horackova, K., Vocka, M., Lopatova, S., Zemankova, P., Kleibl, Z. & Soukupova, J. 2024. **PRDM1 rs2185379, unlike BRCA1, is not a prognostic marker in patients with advanced ovarian cancer.** *Cancer Biomark*, 40, 199-203. IF₂₀₂₃ = 2,2 (viz Příloha 4)

Autorský podíl: HRMA, analýza a interpretace dat, konfirmace nalezených variant, příprava manuskriptu.

Prognóza pacientek s OC je nepříznivá. Pětileté přežití se pohybuje pouze kolem 50 %, s čímž souvisí i snaha o identifikaci možných prognostických faktorů v rámci dostupných genetických a klinickopatologických dat. V případě genetických faktorů se může jednat o germinální patogenní varianty i běžné polymorfismy. V uvedených člancích jsme se zaměřili na GPV v genech *BRCA1/2* a na polymorfismus rs2185379 v genu *PRDMI*, který byl již dříve asociován s dlouhodobým přežitím bez relapsu u pacientek s diagnózou pokročilého OC u japonské populace [98]. V případě klinickopatologických charakteristik jsme zohlednili věk nástupu onemocnění, stádium onemocnění, histologický typ OC a menoaktivitu.

Pomocí HRMA a vybraných dat z celoexomového sekvenování jsme úspěšně provedli genotypizaci polymorfismu rs2185379 v genu *PRDMI* u 545/555 pacientek diagnostikovaných s OC v pokročilém stádiu a s dostupnou DNA, u 541 z nich byly dostupné informace o jejich přežití.

Dále jsme shromáždili dostupná klinickopatologická data a informace o přežití u 82/123 pacientek s OC s časným nástupem (<30 let) a 917 OC pacientek s pozdním nástupem OC (>30 let) [22], celkem se tedy jednalo o 999 OC pacientek s dostupnými informacemi. Z dostupných dat jsme provedli analýzu přežití OC pacientek pomocí Kaplan-Meierových křivek. Výsledky ukazují, že:

- Polymorfismus rs2185379 v genu *PRDMI* není pozitivním prognostickým faktorem přežití u pacientek s pokročilým OC v české populaci.
- GPV v *BRCA1/2* jsou pozitivním prognostickým faktorem přežití u pacientek s OC ve srovnání s pacientkami s OC bez GPV v HBOPC genech.
- Starší (>30 let) a postmenopauzální OC pacientky mají horší prognózu než pacientky s OC s časným nástupem (<30 let) a premenopauzální.
- OC jiného histologického typu než HGSC, a především LGSC, je asociováno s lepší prognózou přežití bez ohledu na věk nástupu onemocnění.

4.2.1. Polymorfismus rs2185379 v genu *PRDM1*

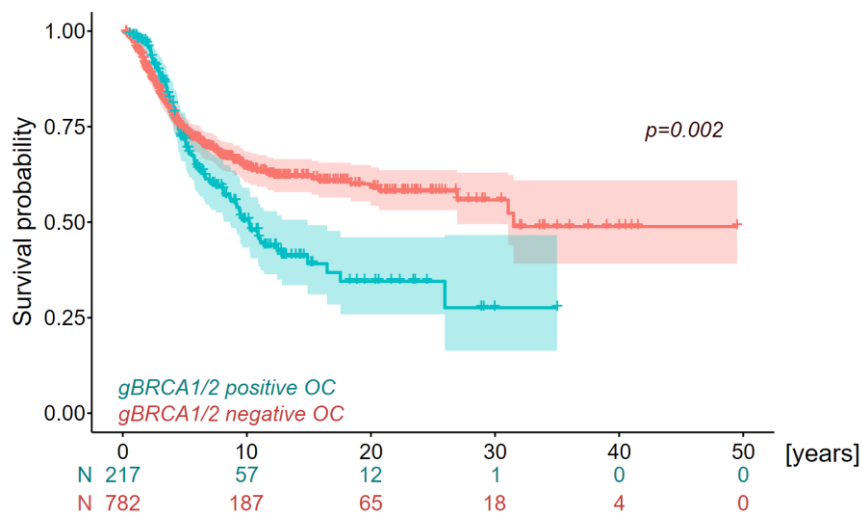
Pomocí HRMA a výběru dat z celoexomového sekvenování jsme identifikovali 508 nenosiček a 37 nosiček (všechny v heterozygotním stavu) polymorfismu rs2185379 v genu *PRDM1*. Ač mezi pacientkami s přežitím >5 let bylo 6,4 % nosiček tohoto polymorfismu v porovnání s 5,1 % nosiček mezi pacientkami s přežitím <5 let, nebylo nosičství polymorfismu rs2185379 statisticky signifikantně asociováno s delším přežitím ($p=0,3$). Naopak u podskupiny postmenopauzálních žen bylo nosičství rs2185379 hraničně signifikantně asociováno s horší prognózou (HR=1,54; 95%CI 1,01–2,38 $p=0,046$) [107].

4.2.2. GPV v genech *BRCA1/2*

U skupiny 555 pacientek s pokročilým OC jsme identifikovali 112 nosiček GPV v genu *BRCA1*, které vykazovaly signifikantně lepší přežití než nenosičky (HR=0,65; 95%CI 0,48–0,87; $p=4,5\times 10^{-4}$). Zajímavé ovšem bylo, že po 11 letech od diagnózy se v případě pokročilého OC tato výhoda setřela a poté se trend dokonce obrátil ve prospěch nenosiček [107].

U skupiny všech 999 OC pacientek jsme identifikovali 217 nosiček GPV v genu *BRCA1/2*, u nichž jsme pozorovali signifikantně lepší přežití než u nenosiček (HR=0,69; 95%CI 0,55–0,88; $p=0,002$) (**Obr. 7**). Výhoda přežití se pro nosičky GPV v *BRCA1/2* vyrovnala po 5 letech a poté došlo k opačnému efektu, kdy lépe přežívaly nenosičky [106].

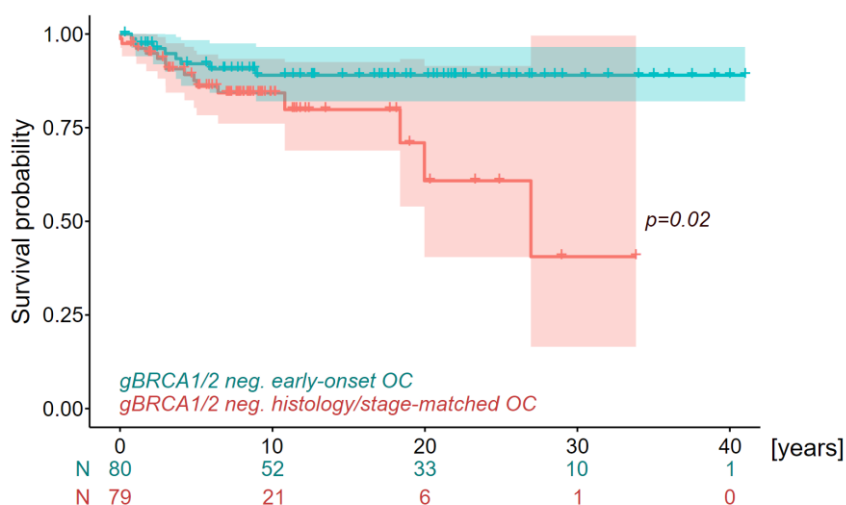
Obr. 7: Analýza přežití nosiček vs. nenosiček GPV v genu *BRCA1* nebo *BRCA2* na souboru 999 pacientek s OC



4.2.3. Věk nástupu onemocnění a menoaktivita

Skupinu všech 999 OC patientek s dostupnými daty jsme dle věku nástupu onemocnění rozdělili na 82 patientek s OC s časným nástupem (<30 let) a 917 s pozdním nástupem (>30 let). Patientky s časným nástupem měly významně lepší prognózu a dlouhodobé přežití (HR=0,17; 95%CI 0,09–0,34; $p=8\times 10^{-9}$) [106]. Protože zastoupení prognosticky odlišných histologických typů OC se mezi patientkami s diagnózou do 30 a nad 30 let lišilo, provedli jsme také analýzu přežití u patientek s diagnózou do 30 let a skupinou patientek s diagnózou OC odpovídající histologie a stádia ve věku nad 30 let bez GPV v HBOPC genech, kdy jedinou odlišnou proměnnou byl právě věk v době diagnózy. Tato analýza ukázala lepší přežití u mladých patientek (HR=0,37; 95%CI 0,15–0,90; $p=0,02$) a poukázala na věk v době diagnózy jako nezávislý pozitivní prognostický faktor (**Obr. 8**) [106].

Obr. 8: Analýza přežití OC nenosiček GPV v HBOPC genech s časným nástupem (<30 let) vs. >30 let s OC odpovídající histologie a stádia na souboru 999 patientek s OC



Stejný trend jsme pozorovali i u podskupiny 555 patientek s pokročilým OC, z nichž 554 mělo k dispozici údaje o menoaktivitě. Premenopauzální patientky (N=165) přežívaly signifikantně déle než patientky s postmenopauzální diagnózou OC (N=389; HR=0,40; 95%CI 0,31–0,52; $p=4,2\times 10^{-11}$). Prognóza se s rostoucím věkem v době diagnózy každým rokem zhoršovala (HR=1,05 za rok; 95%CI 1,04–1,07; $p=2\times 10^{-6}$) [107].

4.2.4. Histologický typ OC

Ve skupině 555 žen s pokročilým OC bylo 497 pacientek s OC serózního typu, z nichž se ve 447 případech jednalo o HGSC a ve 45 případech o LGSC (u 5 pacientek nebyl grade znám). Minoritní zastoupení LGSC není překvapivé, obecně HGSC tvoří cca 70 % všech epiteliálních OC a je typický pro pacientky s OC s pozdním nástupem. LGSC byl asociován se signifikantně lepší prognózou pacientek (HR=0,48; 95%CI 0,32–0,71; $p=4\times 10^{-4}$), stejně jako obecně nádory jiné histologie než HGSC (HR=0,44; 95%CI 0,32–0,60; $p=2\times 10^{-7}$) [107].

Analýza přežití u pacientek s LGSC (z nichž 19 onemocnělo <30 let a 19 onemocnělo >30 let) neprokázala rozdíl v přežití mezi pacientkami s LGSC <30 a >30 lety [106].

5. Diskuse

V rámci komplexní studie genetické predispozice k OC s časným nástupem (<30 let) jsme provedli germinální genetické testování 123 pacientek pomocí celoexomového sekvenování na úrovni DNA i RNA doplněného o analýzy PRS a HLA typizaci. Skupina pacientek s OC s časným nástupem se od OC pacientek s klasickým pozdním nástupem (po 60. roce života) výrazně odlišuje v některých klinickopatologických charakteristikách včetně nečekaně nízkého podílu nosiček GPV <10 % [22, 24, 26, 119, 120]. Záchytnost GPV v HBOPC predispozičních genech dle NCCN [10] v rámci naší studie byla celkově 13,8 % (17/123), ale pouze 4,9 % (6/123) v OC predispozičních genech [10]. Z toho pouze dvě pacientky nesly GPV v hlavních predispozičních genech *BRCA1/2* (2/123; 1,6 %).

Tyto výsledky jsou plně v souladu s již dříve publikovanými výsledky genetických analýz u pacientek s časným OC [22, 24, 26, 119, 120] (**Tabulka 4**). První, kteří se tímto tématem zabývali, byli Stratton *et al.* (1999) [26], kteří v té době testovali pouze geny *BRCA1*, *MLH1*, *MSH2* a část *BRCA2*. Jejich soubor zahrnoval 169 pacientek diagnostikovaných s OC <30 let a nenalezli mezi nimi ani jednu nosičku GPV ve výše zmíněných 4 testovaných lokusech. V posledních letech byly dále publikovány čtyři větší studie, jejichž součástí byla i analýza mladých pacientek s OC, a to jmenovitě Carter *et al.* (2018) [24], Lhotova *et al.* (2020) [22], Herold *et al.* (2023) [120] a Flaum *et al.* (2023) [119], kteří identifikovali 2/147 (1,4 %), 6/84 (7,1 %), 3/83 (3,6 %) a 4/77 (5,2 %) nosiček GPV v OC predispozičních genech. Flaum *et al.* [119] ve své studii britských pacientek uvádí zvýšenou frekvenci *MSH2* GPV nosiček (4/77; 5,2 %). V naší skupině pacientek byla přítomnost GPV v *MSH2* identifikována pouze jednou (1/123; 0,8 %). Zmiňované čtyři studie využívaly přístupu panelového sekvenování v rozsahu 15-219 testovaných genů. I přes různý rozsah vyšetření v porovnání s námi zvoleným přístupem celoexomového sekvenování byl záchyt GPV v OC predispozičních genech řádově stejný.

Tabulka 4: Výsledky germinálního genetického testování nádorové predispozice u pacientek s OC s časným nástupem (<30 let) - srovnání naší studie [106] s výsledky v literatuře (upraveno podle [27])

Studie	Populace	Soubor pacientek	Počet testovaných genů	Počet všech OC pac.	Počet OC pac. <30 let	Věk v době dg. OC pac. <30 let	OC pacientek s časným nástupem (<30 let)			
							Počet nosiček GPV v OC genech (%)	GPV v OC predispozičních genech	Počet nosiček GPV v <i>CHEK2</i> (%)	GPV v dalších HBOPC predispozičních genech
Horackova (2024) [106]*	CZ	OC <30 let	WES	123	123	15-30	6 (4,9 %)	1× <i>BRCA1</i> ; 1× <i>BRCA2</i> ; 1× <i>BRIP1</i> ; 1× <i>MSH2</i> ; 2× <i>RAD51C</i>	6 (4,9 %)	2× <i>ATM</i> ; 2× <i>BARD1</i> ; 1× <i>PMS2</i> ; 1× <i>TP53</i>
Stratton (1999) [26]	UK	OC <30 let	4**	69	69	13-30	0***	0	0	0
Carter (2018) [24]	US	OC	15	439	147	6-30	2 (1,4 %)	1× <i>BRCA1</i> ; 1× <i>BRIP1</i>	5 (3,4 %)	3× <i>ATM</i> ; 1× <i>BARD1</i> ;
Lhotova (2020) [22]*	CZ	OC	219	1333	84	15-30	6 (7,1 %)	2× <i>BRCA1</i> ; 1× <i>BRCA2</i> ; 2× <i>RAD51C</i> ; 1× <i>STK11</i>	4 (4,8 %)	1× <i>ATM</i> ; 1× <i>BARD1</i> ;
Herold (2023) [120]	GER	OC	25	206	83	13-30	3 (3,6 %)	1× <i>BRIP1</i> ; 2× <i>SMARCA4</i>	0	1× <i>PMS2</i> ; 1× <i>TP53</i>
Flaum (2023) [119]	UK	OC <30 let	15	77	77	15-30	4 (5,2 %)	4× <i>MSH2</i>	0	1× <i>PMS2</i>

Dg., diagnóza; GPV, germinální patogenní/pravděpodobně patogenní variant; HBOPC, syndrom hereditárního karcinomu prsu, ovarií a pankreatu; OC, nádory ovaria; pac, pacientky; WES, celoxomové sekvenování *skupiny pacientek se částečně překrývají ** u *BRCA2* byla analyzována pouze část genu v rámci OC regionu *** nalezená varianty *MLH1*:c.1853A>C/p.Lys618Thr a *MLH1*:c.1000G>C/p.Asp304His nejsou aktuálně považovány za patogenní/pravděpodobně patogenní.

Mimo GPV v NCCN asociovaných OC predispozičních genech [10] jsme se v rámci komplexní genetické analýzy pacientek s OC s časným nástupem zabývali i kandidátními geny z řad dalších HBOPC predispozičních genů. Nejčastěji alterovaným nádorovým predispozičním genem vůbec byl v naší skupině pacientek s OC <30 let gen *CHEK2*. Tento gen není dosud jasně asociován s OC, ale je znám jako středně penetrantní gen pro FBC [10]. V naší skupině OC pacientek jsme identifikovali 6/123 (4,9 %) nosiček, což odpovídalo i záchytu americké studie Carter *et al.* [24], kteří našli 5/147 (3,4 %) nosiček mezi OC pacientkami <30 let (**Tabulka 4**). Jednotlivé případy GPV v *CHEK2* u pacientek s OC <30 let byly dále publikovány v rámci brazilské, norské a polské analýzy dědičné predispozice k OC [121-123]. GPV v *CHEK2* byly také v nedávné studii z britské biobanky signifikantně asociovány s rizikem OC (RR=2,33; 95%CI 1,37-3,97; $p=1,73 \times 10^{-3}$) [124]. Je zajímavé, že GPV v *CHEK2* byly asociovány s nižším věkem v době diagnózy v porovnání s HBOPC GPV negativními pacientkami s pozdním nástupem analyzovanými v rámci dřívější studie [22]. Nalezená zvýšená frekvence *CHEK2* GPV naznačuje možné širší zapojení jeho genového produktu do OC patogeneze, především u OC pacientek s časným nástupem, ovšem je třeba tato data ověřit na větším souboru pacientek ideálně s doplněním funkčních studií.

Genetická nádorová predispozice podobná FBC byla u naší skupiny pacientek s OC s časným nástupem podpořená i výsledky PRS analýzy. Pomocí deseti testovaných SNP setů designovaných přímo pro OC [73, 77-81, 125-128] nebylo možné stratifikovat OC pacientky <30 let od kontrol. OC SNP sety jsou však cílené primárně pro HGSC, kterých je mezi OC s časným nástupem velmi málo. Vliv histologického typu jsme ověřili na skupině HGSC pacientek [22], jež bylo možné diskriminovat od kontrol pomocí čtyř z deseti testovaných SNP setů [73, 77, 78, 81]. Naopak při využití SNP setu PRS₃₁₃ [75], který je designovaný pro stratifikaci rizika vzniku FBC, bylo možné statisticky signifikantně stratifikovat pacientky s OC <30 let i ty s pozdním nástupem a odpovídající histologií a stádiem onemocnění od nenádorových kontrol. Tyto výsledky tedy naznačují možný širší vliv SNP obsažených v PRS₃₁₃ i za hranici FBC včetně OC jiných histologických typů než HGSC.

Polygenní dědičnost může být hodnocena také pomocí kvantifikace germinální mutační zátěže. V rámci naší komplexní genetické analýzy jsme z identifikovaných GPV z celoexomových dat vypočítali germinální mutační zátěž u každé pacientky a kontroly - zátěž byla u pacientek signifikantně vyšší než u kontrol. Germinální mutační zátěž podle Qing *et al.* [129] negativně koreluje s věkem nádorových pacientů v době diagnózy,

a to včetně OC. Uvažuje se, že vyšší počet GPV v nádorových predispozičních genech přispívá k maligní transformaci buněk u mladších pacientek, a naopak u starších pacientek hraje významnější roli akumulace somatických alterací [129]. Zvýšená germinální mutační zátěž může tedy přispívat ke zvýšenému riziku rozvoje OC u mladých pacientek.

Kromě propojení OC <30 let s FBC na úrovni genetických predispozic naše výsledky komplexní genetické analýzy naznačují i druhou možnou linku související s protinádorovou imunitou a její imunogenetickou predispozicí. Se stejnou frekvencí jako *CHEK2* GPV jsme identifikovali GPV v genu *LY75-CD302* (6/123; 4,9 %). Tento gen se alternativně transkribuje a jeho produkty jsou si strukturně vysoce podobné proteiny LY75 (CD205) a CD302. Oba tyto proteiny byly popsány u dendritických buněk v souvislosti s procesováním antigenů pro prezentaci na HLA I. třídy (LY75) a následnou buněčnou adhezí a migrací těchto buněk do lymfatických uzlin (CD302) [130, 131]. LY75 byl také popsán v souvislosti s epiteliálně-mesenchymální tranzicí a tvorbou metastáz u buněk epiteliálního OC [132, 133]. Čtyři ze šesti uvedených GPV v *LY75-CD302* se nacházely v exonu 31, který kóduje funkční doménu typu *C-type lectin/lectin-like* důležitou právě pro výše uvedené buněčné procesy [131, 134]. *LY75-CD302* nebyl dosud jasně klinicky asociován s žádným onemocněním, nicméně jeho GPV byly zaznamenány např. u familiárního Hodgkinova lymfomu s časným nástupem [135] nebo v asociaci s klonální hematopoézou [136]. S příchodem širšího využití celoxomového sekvenování lze tedy předpokládat, že zapojení alterací *LY75-CD302* v patogenezi různých onemocnění vč. nádorových bude v budoucnosti dále studováno a detailněji popsáno.

Imunogenetické predispozice k onemocnění mohou být také ovlivněny složením HLA molekul. Ty slouží k prezentaci endogenních nebo exogenních antigenů peptidové povahy na povrchu všech jaderných buněk (HLA I. třídy) nebo specializovaných antigen prezentujících buněk (HLA II. třídy) pro T lymfocyty. Proces antigenní prezentace zprostředkovaný pomocí HLA je pro protinádorovou imunitu důležitý ve formě prezentace neoantigenů a následné rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem. Vliv mohou hrát jak konkrétní HLA alely tak jejich kombinace v haplotypu a zygotita, čímž je podmíněna širší spektra prezentovatelných antigenů [137]. V případě OC byla již v literatuře popsána zvýšená frekvence určitých haplotypů (HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 a HLA-DQA1*01:01-DQB1*05:01-DRB1*10:01) i konkrétních alel HLA-(DRB1*03:01 - homozygotní i heterozygotní; HLA-DQB1*02:01 - homozygotní) u německých pacientek s OC do 45 let [83]. Obdobně byla ve studii OC pacientek

s pokročilým onemocněním ze severní Evropy nalezena zvýšená frekvence haplotypů HLA-A*2-HLA-B*5/8/12/15, HLA-A*2-HLA-DRB1*03/04 a HLA-A*2-HLA-B*8-HLA-DRB1/03 [138]. V naší skupině 123 pacientek s OC s časným nástupem jsme identifikovali pět signifikantně nabožených HLA alel, kdy nejčastější byla HLA-DRB1*11:01 identifikovaná u 24/123 (19,5 %) pacientek. Tato alela byla již dříve asociována se zvýšeným rizikem FBC u italské populace [139]. Dále jsme v lokusu HLA-DQA1 identifikovali jednu signifikantně rizikovou (DQA1*01:03) a protektivní (DQA1*03:03) alelu. Tyto DQA1 alely nebyly dosud v literatuře s nádorovými onemocněními jasně asociovány, ale např. jiná alela daného lokusu - DQA1*03:01 - je popsána jako riziková pro FBC s časným nástupem onemocnění [140]. Frekvence HLA alel/haplotypů je vysoce populačně specifická a tak zásadní roli pro interpretaci hraje volba dostatečně velkého, populačně specifického kontrolního souboru. Vliv na typizaci má i použitá genotypizační metoda k určení HLA haplotypů ze sekvenačních dat, která se vyznačuje vznikem specifickým chyb [141-143]. V případě analýzy HLA imunogenetických predispozic u českých pacientů se solidními tumory je tedy do budoucna potřeba provést rozsáhlejší analýzu a ideálně i rozšířit kontrolní soubor nenádorových kontrol, kdy aktuálně největší dostupná databáze obsahuje 5 099 jedinců z českého registru dárců kostní dřeně z roku 2014 [144].

Výsledky HLA typizace pacientek s OC s časným nástupem byly využity nejen k analýze frekvence jednotlivých alel, ale také ke stanovení zygotity v osmi testovaných lokusech u jednotlivých pacientek a kontrol. Pacientky byly signifikantně častěji nosičkami třech a více homozygotních HLA lokusů než kontroly (44/123 vs. 15/227; $p=5\times 10^{-9}$). Naopak heterozygotní nosičky ve všech osmi lokusech byly mezi pacientkami signifikantně méně časté než mezi kontrolami (15/123 vs. 85/227; $p=3\times 10^{-7}$). Homozygotita v lokusech HLA II. třídy byla u pacientek častější než v HLA I. třídy ve srovnání s kontrolami. V literatuře jsou HLA homozygoti v lokusech II. třídy asociováni se zvýšeným rizikem nádorů plic, hlavy a krku a non-Hodgkinova lymfomu, zatímco homozygoti v HLA I. třídy byly asociováni s rizikem rozvoje Hodgkinova lymfomu [84]. U pacientů s kolorektálním karcinomem byla homozygotita HLA asociována se signifikantně vyšším rizikem rozvoje tohoto onemocnění [145]. Mechanisticky můžeme nižší rozmanitost HLA spojovat s nižším množstvím T buněčných receptorů, jejich zvýšenou klonalitou a obecně s nižším množstvím tumor infiltrujících T lymfocytů v nádoru [145], tedy s horší protinádorovou T buněčnou imunitou. HLA homozygotita je v literatuře také často diskutována ve spojitosti s úspěšností

léčby a přežitím pacientů se solidními tumory. Především úspěšnost léčby pomocí imunitních check-point inhibitorů je u HLA homozygotů spojená s horší prognózou a celkovým přežitím ve srovnání s HLA heterozygoty [95]. V rámci naší testované skupiny 123 pacientek s OC s časným nástupem však nebyla žádná z probandek léčena pomocí imunitních check-point inhibitorů, a tudíž není možné se na základě našich dat k problematice vyjádřit.

Výsledky integrované genetické analýzy dále dávají prostor k úvaze o možném kombinovaném podílu HLA a PRS na vzniku OC u velmi mladých žen. Pět z jedenácti (45,5 %) pacientek stratifikovaných pomocí PRS₃₁₃ do desátého decilu jako vysoce rizikové bylo zároveň nosičkami alely HLA-DRB*11:01 signifikantně nabohacené v našem souboru a/nebo bylo homozygotkami ve třech a více testovaných HLA lokusech. Korelace PRS a HLA byla již testována u jiných diagnóz [146, 147], kde se však např. u diabetu I. typu PRS a HLA ukázaly jako nezávislé faktory [146]. Kombinace genetických a imunogenetických analýz je však typická spíše pro autoimunitní choroby a u solidních nádorů, kde není HLA analýza běžným vyšetřením, je potřeba korelace obou faktorů dále ověřit. SNP v rámci HLA clusteru jsou již v některých PRS SNP setech obsaženy [148] a s trendem stále se rozšiřujících PRS analýz se dá potenciálně očekávat i vyšetření HLA do vyvíjejících se SNP setů pro výpočet PRS pro nádorová onemocnění.

Imunogeneticky ovlivněné lepší přežití pacientek s OC je diskutováno i ve spojitosti s germinálním nosičstvím některých polymorfismů, jako je např. rs2185379 v genu *PRDMI*. Gen *PRDMI* kóduje protein BLIMP1, který je zapojen v buněčné signalizaci, která ve výsledku vede ke zvýšení exprese PD-L1 [149]. PD-L1 je ligand receptoru PD-1 se supresivním efektem na protinádorovou imunitu, který působí mj. potlačením HLA-TCR dependentní aktivace T lymfocytů [150]. U nosičů genetických variant v genu *PRDMI* se tedy dá spekulovat o lepší prognóze pacientů zprostředkované T buněčnou protinádorovou imunitní odpovědí. U japonské populace bylo nosičství polymorfismu rs2185379 v genu *PRDMI* asociováno s lepším dlouhodobým přežitím pacientek s pokročilým OC (6,8krát, $p=0,013$) [98]. Japonská studie přežití 24 OC pacientek byla doplněna o funkční studie na myším modelu, kde autoři popsali vyšší množství tumor infiltrujících T lymfocytů v nádoru a menší velikost diseminovaných nádorů v peritoneu u heterozygotů daného polymorfismu [98]. V rámci naší studie zahrnující 545 českých pacientek s pokročilým OC jsme však tyto závěry nepotvrdili a nosičství varianty rs2185379 v genu *PRDMI* nebylo spojeno se zlepšeným přežitím. Nicméně i jiné polymorfismy v genu

PRDMI byly v literatuře popsány v souvislosti s dalšími solidními tumory. U čínských pacientů hepatocelulárním karcinomem asociovaným s HBV, kteří byli zároveň nosiči varianty rs1010273 bylo zaznamenáno signifikantně lepší celkové přežití [151]. Uvedené polymorfismy mají však v asijské populaci vyšší frekvenci než u Evropanů, a tak se dá spekulovat o populačně specifickém vlivu. Proto je třeba výsledky asociací běžných polymorfismů na klinickopatologické charakteristiky pacientů vždy interpretovat a ověřit v kontextu specifické populace.

Vliv na přežití pacientek s OC je spojen i s nosičstvím GPV ve vysoce penetrantních genech *BRCA1/2*. V rámci skupiny 555 pacientek s pokročilým OC i druhé skupiny 999 neselektovaných OC pacientek vykazovaly nosičky GPV v *BRCA1*, resp. *BRCA1/2*, lepší přežití. Zajímavé ovšem bylo, že po 11, resp. 5 letech od diagnózy došlo k vyrovnání křivek přežití nosiček vs. nenosiček a naopak dokonce k otočení trendu, kdy nenosičky *BRCA1/2* GPV vykazovaly delší přežití. Tyto údaje jsou ve shodě s dalšími studiemi, které se dlouhodobým přežitím *BRCA1/2* GPV nosiček u pacientek s OC zabývaly. Jmenovitě McLaughlin *et al.* [88] u pacientek z USA, stejně jako Lavie *et al.* u pacientek z Izraele [152] popsali shodně setření rozdílu výhody přežití *BRCA1/2* GPV nosiček po 10 letech od diagnózy, a nizozemská studie Heemskerk-Gerritsen *et al.* [89] pozorovala vyrovnání výhody zlepšeného přežití *BRCA1/2* GPV nosiček po 6 letech od diagnózy. Možným vysvětlením je lepší odpověď na léčbu deriváty platiny nebo PARP inhibitory u nosiček [90, 91]. Dalším možným vlivem je mladší věk pacientek v době diagnózy u nosiček *BRCA1/2* GPV v porovnání s nenosičkami [74].

V rámci naší analýzy přežití se věk v době diagnózy ukázal jako důležitý faktor pro přežití pacientek, avšak nezávislý od nosičství GPV. Ve skupině 999 neselektovaných OC pacientek jsme pozorovali lepší přežití u mladých pacientek diagnostikovaných s OC <30 let. Stejně tak premenopauzální pacientky ze skupiny 555 pacientek s pokročilým OC vykazovaly lepší přežití než postmenopauzální pacientky s OC. Tyto výsledky korelují s publikovanou kohortou 13 222 britských žen s OC, stejně jako jejich výsledky ohledně vlivu histologického typu na přežití [153]. Ve skupině 555 pacientek s pokročilým onemocněním vykazovaly ty s LGSC lepší přežití než pacientky s HGSC. LGSC obecně patří mezi OC I. typu s lepší prognózou na základě nižší proliferativní aktivity buněk, pomalejší progresse onemocnění a diagnózy v dřívějších stádiích onemocnění [19, 20]. Pro pacientky s LGSC je také typický dřívější věk nástupu onemocnění (55,5 vs. 62,6 let; $p < 10^{-4}$) [154]. Zajímavé však je, že u LGSC pacientek s časným nástupem OC bylo popsáno

horší přežití v porovnání s LGSC s pozdním nástupem [33]. Nicméně tuto stratifikaci přežití LGSC pacientek na základě věku jsme nepotvrdili, jelikož jsme při srovnání 19 pacientek <30 let a 19 pacientek >30 let nepozorovali rozdíl v jejich přežití.

Přežití pacientek s OC je dále závislé na stádiu onemocnění, kdy pacientky diagnostikované v nižších stádiích mají lepší prognózu [153]. Také se diskutují další negativní faktory, jako je např. vyšší BMI pacientek, kouření a jiné faktory související se životním stylem [153]. Vliv na přežití u OC pacientek má i jejich etnický původ [155, 156]. Těmito parametry jsme se však nezabývali.

6. Závěr

Disertační práce se souhrnně věnuje charakterizaci genetických faktorů, které způsobují nebo přispívají ke vzniku nádorů ovaria a ovlivňují prognózu těchto pacientek. Nádory ovaria patří mezi nádorová onemocnění s nejvyšším podílem hereditární formy a s vysokým počtem identifikovaných nosiček GPV (průměrně >20 %, některé studie uvádí i >30 %). Získané výsledky však potvrzují závěry z dřívějších českých i zahraničních publikací [22, 24, 26, 119, 120] týkajících se nízkého podílu nosiček GPV v OC asociovaných genech mezi pacientkami s OC s časným nástupem, u kterých jsme identifikovali pouze 6/123 OC GPV nosiček (4,9 %). Nad rámec tohoto zjištění byly ve třech zahrnutých publikacích [27, 106, 108] popsány OC kandidátní signifikantně nabohacené alterované geny a alternativní dědičné mechanismy. Navrhli jsme dvě možné trajektorie alternativní dědičnosti: první z nich založenou na asociaci hereditární komponenty u OC <30 let podobnou FBC podpořenou zvýšenou frekvencí GPV v genu *CHEK2*, jehož GPV jsou asociované se středním rizikem vzniku FBC, avšak dosud ne s OC; stratifikací pacientek s OC s časným nástupem od kontrol pomocí PRS₃₁₃ SNP setu [75, 76] designovaného pro FBC; a výsledky *overrepresentation* analýzy, která prokázala signifikantní nabohacení GPV v setu genů asociovaných s karcinomem prsu. Druhá možná trajektorie alternativní dědičnosti k OC <30 let je založená na imunogenetické predispozici a vychází ze zvýšené frekvence GPV v genu *LY75-CD302*, který je zapojený v imunitní odpovědi zprostředkované prezentací antigenů; spolu se zvýšenou frekvencí HLA alely DRB1*11:01 popsané již dříve u pacientek s FBC s časným nástupem [139]; zvýšenou frekvencí HLA homozygotních nosiček a zvýšenou germinální mutační zátěží u pacientek.

Druhá část disertační práce se věnuje analýze přežití pacientek s OC a faktorům, které přežití ovlivňují, a vychází z výsledků publikovaných ve dvou původních článcích [106, 107]. V souladu s literaturou [88, 89, 152, 153] jsme popsali lepší přežití u pacientek s OC, které byly nosičkami GPV v genech *BRCAl/2*; pacientek mladších a pacientek s OC jiného histologického typu než HGSC, a to především LGSC. Na rozdíl od dříve publikovaných výsledků [98] jsme však nepotvrdili, že nosičství polymorfismu rs2185379 v genu *PRDMI* působí jako pozitivní prognostický faktor u pacientek s pokročilým OC v české populaci.

Výsledky tedy naznačují, že mendelovská monogenní dědičnost k nádorovým onemocněním založená na přítomnosti GPV v jasně asociovaných genech není u OC

s časným nástupem na rozdíl od OC s klasickým pozdním nástupem častá a je potřeba se v rámci klinického výzkumu dále věnovat identifikaci kandidátních predispozičních genů. Dále je však nezbytné se zaměřit i na alternativní mechanismy dědičnosti, jako jsou např. polygenní nebo imunogenetické predispozice. Výsledky dále popisují vliv genetických a klinickopatologických faktorů na přežití pacientek s OC v české populaci a mohou přispět k lepšímu porozumění vzniku onemocnění.

7. Další publikace autorky

Seznam dalších publikací autorky, které s tématem disertační práce souvisí pouze částečně:

Horackova, K., Frankova, S., Zemankova, P., Nehasil, P., Cerna, M., Neroldova, M., Otahalova, B., Kral, J., Hovhannisyan, M., Stranecky, V., Zima, T., Safarikova, M., Kalousova, M., CZEKANCA Consortium, Novotny, J., Sperl, J., Borecka, M., Jelinkova, S., Vocka, M., Janatova, M., Kleiblova, P., Kleibl, Z., Jirsa, M. & Soukupova, J. 2022. **Low Frequency of Cancer-Predisposition Gene Mutations in Liver Transplant Candidates with Hepatocellular Carcinoma.** *Cancers*, 15(1):201. **IF₂₀₂₂ = 5,2**

Autorský podíl: příprava sekvenčních knihoven a provedení NGS, analýza a interpretace dat, konfirmace nalezených variant, příprava manuskriptu.

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. 2023. **Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer.** *Oncol Lett*, 25, 216. **IF₂₀₂₃ = 2,5**

Autorský podíl: konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu.

Kleiblova, P., Cerna, M., Zemankova, P., Matejkova, K., Nehasil, P., Hojny, J., **Horackova, K.**, Janatova, M., Soukupova, J., Stastna, B. & Kleibl, Z. 2024. **Parallel DNA/RNA NGS Using an Identical Target Enrichment Panel in the Analysis of Hereditary Cancer Predisposition.** *Folia Biol*, 70, 62-73. **IF₂₀₂₃ = 1,1**

Autorský podíl: příprava sekvenčních knihoven a provedení NGS, editování manuskriptu.

Hovhannisyan, M., Zemankova, P., Nehasil, P., Matejkova, K., Borecka, M., Cerna, M., Dolezalova, T., Dvorakova, L., Foretova, L., **Horackova, K.**, Jelinkova, S., Just, P., Kalousova, M., Kral, J., Machackova, E., Nemcova, B., Safarikova, M., Springer, D., Stastna, B., Tavandzis, S., Vocka, M., Zima, T., Soukupova, J., Kleiblova, P., Ernst, C., Kleibl, Z. & Janatova, M. 2024. **Population-specific validation and comparison of the performance of 77- and 313-variant polygenic risk scores for breast cancer risk prediction.** *Cancer*, 130(17):2978-2987. **IF₂₀₂₃ = 6,1**

Autorský podíl: příprava sekvenčních knihoven a provedení NGS, editování manuskriptu.

Soukupova, J., Stastna, B., Kanwal, M., Hojny, J., Zemankova, P., Borecka, M., Cerna, L., Cerna, M., Cerna, M., Curtisova, V., Dolezalova, T., Duskova, P., Foretova, L., Havranek, O., **Horackova, K.**, Hovhannisyan, M., Hruskova, L., Chvojka, S., Janatova, M., Janikova, M., Jelinkova, S., Just, P., Kalousova, M., Kleiblova, P., Kosarova, M., Koudova, M., Kral, J., Krausova, M., Krutilkova, V., Machackova, E., Matejkova, K., Michalovska, R., Nehasil, P., Nemcova, B., Novotny, J., Palek, M., Pesek, P., Safarikova, M., Scheinost, O., Springer, D., Stolarova, L., Stranecky, V., Subrt, I., Tavandzis, S., Tureckova, E., Vesela, K., Vlckova, Z., Vocka, M., Zima, T., Macurek, L., Kleibl, Z. & CZECA Consortium. 2024. **A comprehensive study evaluating germline FANCG variants in predisposition to breast and ovarian cancer.** *Cancer Med*, 13, e70103. IF₂₀₂₃ = 2,9

Autorský podíl: příprava sekvenčních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu.

Stoyanov, M., Martinikova, A. S., Matejkova, K., **Horackova, K.**, Zemankova, P., Burdova, K., Zemanova, Z., Kleiblova, P., Kleibl, Z. & Macurek, L. **PPM1D activity promotes cellular transformation by preventing senescence and cell death.** *Oncogene*. IF₂₀₂₃ = 6,9

Autorský podíl: příprava sekvenčních knihoven a provedení NGS.

8. Seznam použité literatury

1. ÚZIS, *Zdravotnická ročenka České republiky 2021*. 2022.
2. ÚZIS, *Novotvary 2019–2021 ČR: Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice*. 2023.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
5. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
6. Knudson, A.G., *Cancer genetics*. Am J Med Genet, 2002. **111**(1): p. 96-102.
7. Pharoah, P.D., et al., *Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 850-60.
8. Frank, C., et al., *Population Landscape of Familial Cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12891.
9. Garreffa, E. and R. Lee, *Hereditary and familial cancer*. Surgery (Oxford), 2024. **42**(3): p. 177-183.
10. NCCN. *Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic (Version 1.2023)*. 2022; Dostupno z: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf.
11. Ligtenberg, M.J., et al., *EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients*. Fam Cancer, 2013. **12**(2): p. 169-74.
12. NCCN. *Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal (Version 2.2023)*. 2023; Dostupno z: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf.
13. Wojtyla, C., et al., *European trends in ovarian cancer mortality, 1990-2020 and predictions to 2025*. Eur J Cancer, 2023. **194**: p. 113350.
14. SVOD. *Systém pro vizualizaci onkologických dat*. Dostupno ke dni 2. 7. 2024; Dostupno z: www.svod.cz.
15. SEER. *National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*. Dostupno ke dni 2. 7. 2024; Dostupno z: www.seer.cancer.gov.
16. Kim, M.K., et al., *A hospital-based case-control study of identifying ovarian cancer using symptom index*. J Gynecol Oncol, 2009. **20**(4): p. 238-42.
17. Prat, J., *New insights into ovarian cancer pathology*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 10**: p. x111-7.
18. Lockley, M., S.J. Stoneham, and T.A. Olson, *Ovarian cancer in adolescents and young adults*. Pediatr Blood Cancer, 2019. **66**(3): p. e27512.
19. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded*. Am J Pathol, 2016. **186**(4): p. 733-47.
20. Matz, M., et al., *The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2)*. Gynecol Oncol, 2017. **144**(2): p. 405-413.
21. Network, C.G.A.R., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 609-15.
22. Lhotova, K., et al., *Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer*. Cancers, 2020. **12**(4).
23. Kanchi, K.L., et al., *Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3156.

24. Carter, N.J., et al., *Germline pathogenic variants identified in women with ovarian tumors*. *Gynecol Oncol*, 2018. **151**(3): p. 481-488.
25. Risch, H.A., et al., *Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer*. *Am J Hum Genet*, 2001. **68**(3): p. 700-10.
26. Stratton, J.F., et al., *The genetic epidemiology of early-onset epithelial ovarian cancer: a population-based study*. *Am J Hum Genet*, 1999. **65**(6): p. 1725-32.
27. Horackova, K., et al., *Early-Onset Ovarian Cancer <30 Years: What Do We Know about Its Genetic Predisposition?* *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(23): p. 17020.
28. GLOBOCAN. *The Global Cancer Observatory*. Dostupno ke dni 2. 7. 2024; Dostupno z: <https://gco.iarc.fr/>.
29. Lalrinpuii, E., et al., *Ovarian Cancer in Young Women*. *Indian J Surg Oncol*, 2017. **8**(4): p. 540-547.
30. Massi, D., et al., *Epithelial ovarian tumors in the reproductive age group: age is not an independent prognostic factor*. *Cancer*. **77**(6): p. 1131-6.
31. Yoshikawa, K., et al., *Age-related differences in prognosis and prognostic factors among patients with epithelial ovarian cancer*. *Mol Clin Oncol*, 2018. **9**(3): p. 329-334.
32. Chan, J.K., et al., *Ovarian cancer in younger vs older women: a population-based analysis*. *Br J Cancer*, 2006. **95**(10): p. 1314-20.
33. Gershenson, D.M., et al., *Impact of Age and Primary Disease Site on Outcome in Women With Low-Grade Serous Carcinoma of the Ovary or Peritoneum: Results of a Large Single-Institution Registry of a Rare Tumor*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(24): p. 2675-82.
34. *National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*. Dostupno ke dni 2. 7. 2024. Dostupno z: www.seer.cancer.gov/.
35. Zhang, J., et al., *Ovarian cancer histology-specific incidence trends in Canada 1969-1993: age-period-cohort analyses*. *Br J Cancer*, 1999. **91**(1): p. 152-8.
36. Schneider, D.T., et al., *Gonadal and Extragonadal Germ Cell Tumors, Sex Cord Stromal and Rare Gonadal Tumors*. 2012: p. 327-402.
37. Huang, Y., et al., *Histological Characteristics and Early-Stage Diagnosis Are Associated With Better Survival in Young Patients With Epithelial Ovarian Cancer: A Retrospective Analysis Based on Surveillance Epidemiology and End Results Database*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 595789.
38. Ray-Coquard, I., et al., *Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(Suppl 4): p. iv1-iv18.
39. Chiaffarino, F., et al., *Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer*. *Ann Oncol*, 2001. **12**(3): p. 337-341.
40. Huang, Z., et al., *Contraceptive methods and ovarian cancer risk among Chinese women: A report from the Shanghai Women's Health Study*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(3): p. 607-14.
41. Koushik, A., et al., *Hormonal and reproductive factors and the risk of ovarian cancer*. *Cancer Causes Control*, 2017. **28**(5): p. 393-403.
42. Fu, Z., et al., *Lifetime ovulatory years and risk of epithelial ovarian cancer: a multinational pooled analysis*. *J Natl Cancer Inst*, 2023. **115**(5): p. 539-551.
43. Poorolajal, J., E. Jenabi, and S.Z. Masoumi, *Body mass index effects on risk of ovarian cancer: a meta- analysis*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(18): p. 7665-71.

44. Pavanello, M., et al., *Rare Germline Genetic Variants and the Risks of Epithelial Ovarian Cancer*. *Cancers*, 2020. **12**(10).
45. Toss, A., et al., *Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 341723.
46. Lilyquist, J., et al., *Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls*. *Gynecol Oncol*, 2017. **147**(2): p. 375-380.
47. Weber-Lassalle, N., et al., *BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2018. **20**(1): p. 7.
48. Dominguez-Valentin, M., et al., *Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database*. *Genet Med*, 2020. **22**(1): p. 15-25.
49. Kurian, A.W., et al., *Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women*. *JCO Precis Oncol*, 2017. **Nov**(1): p. 1-12.
50. Yang, X., et al., *Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families*. *J Clin Oncol*, 2020. **38**(7): p. 674-685.
51. Narayan, P., et al., *Partner and localizer of BRCA2 (PALB2) pathogenic variants and ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis*. *Gynecol Oncol*, 2023. **177**: p. 72-85.
52. Klimkowski, S., et al., *Peutz-Jeghers Syndrome and the Role of Imaging: Pathophysiology, Diagnosis, and Associated Cancers*. *Cancers*, 2021. **13**(20).
53. De Paolis, E., R.M. Paragliola, and P. Concolino, *Spectrum of DICER1 Germline Pathogenic Variants in Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumor*. *J Clin Med*, 2021. **10**(9).
54. Witkowski, L., et al., *Germline and somatic SMARCA4 mutations characterize small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type*. *Nat Genet*, 2014. **46**(5): p. 438-43.
55. Blanco, A., et al., *Beyond BRCA1 and BRCA2 wild-type breast and/or ovarian cancer families: germline mutations in TP53 and PTEN*. *Clin Genet*, 2010. **77**(2): p. 193-6.
56. Yaui, K., et al., *Ovarian Clear Cell Carcinoma in Cowden Syndrome*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019. **17**(1): p. 7-11.
57. Vibert, R.A.-O., et al., *APC germline pathogenic variants and epithelial ovarian cancer: causal or coincidental findings?* *J Med Genet*, 2022. **60**(5): p. 460-463.
58. Norquist, B.M., et al., *Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma*. *JAMA Oncol*, 2016. **2**(4): p. 482-90.
59. Del Valle, J., et al., *Exploring the Role of Mutations in Fanconi Anemia Genes in Hereditary Cancer Patients*. *Cancers*, 2020. **12**(4).
60. Song, H., et al., *Population-based targeted sequencing of 54 candidate genes identifies PALB2 as a susceptibility gene for high-grade serous ovarian cancer*. *J Med Genet*, 2021. **58**(5): p. 305-313.
61. Subramanian, D.N., et al., *Exome sequencing of familial high-grade serous ovarian carcinoma reveals heterogeneity for rare candidate susceptibility genes*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 1640.
62. Stastna, B., et al., *Germline pathogenic variants in the MRE11, RAD50, and NBN (MRN) genes in cancer predisposition: A systematic review and meta-analysis*. *Int J Cancer*, 2024.
63. OMIM. *Online Mendelian Inheritance in Man*. Dostupno ke dni 2. 7. 2024; Dostupno z: <https://omim.org/>.

64. Domchek, S.M., et al., *Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(4): p. 399-405.
65. Ryan, N.A.J., et al., *Pathological features and clinical behavior of Lynch syndrome-associated ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2017. **144**(3): p. 491-495.
66. Tenedini, E., et al., *Constitutional Mosaicism: A Critical Issue in the Definition of BRCA-Inherited Cancer Risk*. *JCO Precis Oncol*, 2022. **6**(e2200138).
67. Scherz, A., et al., *A New de novo BRCA1 Mutation in a Young Breast Cancer Patient: A Case Report*. *Appl Clin Genet*, 2023. **16**: p. 83-87.
68. Rebbeck, T.R., et al., *Inheritance of deleterious mutations at both BRCA1 and BRCA2 in an international sample of 32,295 women*. *Breast Cancer Res*, 2016. **18**(1): p. 112.
69. Stratton, J.F., et al., *A systematic review and meta-analysis of family history and risk of ovarian cancer*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1998. **105**(5): p. 493-9.
70. Eng, C., et al., *Paternal lineage early onset hereditary ovarian cancers: A Familial Ovarian Cancer Registry study*. *PLOS Genetics*, 2018. **14**(2): p. e1007194.
71. Lose, F., et al., *Skewed X chromosome inactivation and breast and ovarian cancer status: evidence for X-linked modifiers of BRCA1*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**(21): p. 1519-29.
72. Winham, S.J., et al., *Molecular signatures of X chromosome inactivation and associations with clinical outcomes in epithelial ovarian cancer*. *Hum Mol Genet*, 2019. **28**(8): p. 1331-1342.
73. Jia, G., et al., *Evaluating the Utility of Polygenic Risk Scores in Identifying High-Risk Individuals for Eight Common Cancers*. *JNCI Cancer Spectr*, 2020. **4**(3).
74. Kuchenbaecker, K.B., et al., *Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. *JAMA*, 2017. **317**(23): p. 2402-2416.
75. Mavaddat, N., et al., *Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes*. *Am J Hum Genet*, 2019. **104**(1): p. 21-34.
76. Hovhannisyanyan, M., et al., *Population-specific validation and comparison of the performance of 77- and 313-variant polygenic risk scores for breast cancer risk prediction*. *Cancer*, 2024. **130**(17): p. 2978-2987.
77. Jervis, S., et al., *A risk prediction algorithm for ovarian cancer incorporating BRCA1, BRCA2, common alleles and other familial effects*. *J Med Genet*, 2015. **52**(7): p. 465-75.
78. Kuchenbaecker, K.B., et al., *Evaluation of Polygenic Risk Scores for Breast and Ovarian Cancer Risk Prediction in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. *J Natl Cancer Inst*, 2017. **109**(7).
79. Phelan, C.M., et al., *Identification of 12 new susceptibility loci for different histotypes of epithelial ovarian cancer*. *Nat Genet*, 2017. **49**(5): p. 680-691.
80. Yang, X., et al., *Evaluation of polygenic risk scores for ovarian cancer risk prediction in a prospective cohort study*. *J Med Genet*, 2018. **55**(8): p. 546-554.
81. Dareng, E.O., et al., *Polygenic risk modeling for prediction of epithelial ovarian cancer risk*. *Eur J Hum Genet*, 2022. **30**(3): p. 349-362.
82. CanRisk. Dostupno ke dni 18. 7. 2024; Dostupno z: <https://www.canrisk.org/>.
83. Kubler, K., et al., *HLA-class II haplotype associations with ovarian cancer*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(12): p. 2980-5.
84. Wang, Q.L., et al., *Association of HLA diversity with the risk of 25 cancers in the UK Biobank*. *EBioMedicine*, 2023. **92**: p. 104588.
85. Bae, E.H., et al., *Systemic lupus erythematosus is a risk factor for cancer: a nationwide population-based study in Korea*. *Lupus*, 2019. **28**(3): p. 317-323.

86. Zhou, Z., et al., *The five major autoimmune diseases increase the risk of cancer: epidemiological data from a large-scale cohort study in China*. *Cancer Commun (Lond)*, 2022. **42**(5): p. 435-446.
87. Belotte, J., et al., *A Single Nucleotide Polymorphism in Catalase Is Strongly Associated with Ovarian Cancer Survival*. *PLoS One*, 2015. **10**(8).
88. McLaughlin, J.R., et al., *Long-term ovarian cancer survival associated with mutation in BRCA1 or BRCA2*. *J Natl Cancer Inst*, 2013. **105**(2): p. 141-8.
89. Heemskerk-Gerritsen, B.A.M., et al., *Progression-free survival and overall survival after BRCA1/2-associated epithelial ovarian cancer: A matched cohort study*. *PLoS One*, 2022. **17**(9).
90. Pennington, K.P., et al., *Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(3): p. 764-75.
91. DiSilvestro, P., et al., *Overall Survival With Maintenance Olaparib at a 7-Year Follow-Up in Patients With Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer and a BRCA Mutation: The SOLO1/GOG 3004 Trial*. *J Clin Oncol*, 2022. **41**(3): p. 609-617.
92. McCabe, N., et al., *Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 8109-15.
93. Jiang, X., et al., *PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms*. *J Cell Mol Med*, 2019. **23**(4): p. 2303-2313.
94. Colombo, I., et al., *Chasing Immune Checkpoint Inhibitors in Ovarian Cancer: Novel Combinations and Biomarker Discovery*. *Cancers*, 2023. **15**(12): p. 3220.
95. Chowell, D., et al., *Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy*. *Science*, 2018. **359**(6375): p. 582-587.
96. Naranbhai, V., et al., *HLA-A*03 and response to immune checkpoint blockade in cancer: an epidemiological biomarker study*. *Lancet Oncol*, 2022. **23**(1): p. 172-184.
97. Si, W., et al., *Genetic polymorphisms in hMSH2 and hMLH1 genes are associated with prognosis in epithelial ovarian cancer patients*. *Int J Gynecol Cancer*, 2019. **29**(7): p. 1148-1155.
98. Mitamura, T., et al., *Germline PRDMI Variant rs2185379 in Long-Term Recurrence-Free Survivors of Advanced Ovarian Cancer*. *Pharmgenomics Pers Med*, 2022. **15**: p. 977-984.
99. Shi, T., et al., *Significant association of the EXO1 rs851797 polymorphism with clinical outcome of ovarian cancer*. *Onco Targets Ther*, 2017. **10**: p. 4841-4851.
100. Jacobs, I.J., et al., *Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2016. **387**(10022): p. 945-956.
101. Lyu, W., et al., *Early-stage diagnosis of ovarian cancer via digital immunoassay on a SlipChip*. *Talanta*, 2024. **280**: p. 126782.
102. USPSTF, et al., *Screening for Ovarian Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement*. *JAMA*, 2018. **319**(6): p. 588-594.
103. Mikami, M., et al., *Comprehensive serum glycopeptide spectra analysis to identify early-stage epithelial ovarian cancer*. *Sci Rep*, 2024. **14**(1).
104. Liberto, J.M., et al., *Current and Emerging Methods for Ovarian Cancer Screening and Diagnostics: A Comprehensive Review*. *Cancers*, 2022. **14**(12): p. 2885.
105. Martelli, G., et al., *Prophylactic Salpingo-Oophorectomy and Survival After BRCA1/2 Breast Cancer Resection*. *JAMA Surg*, 2023. **158**(12): p. 1275-1284.

106. Horackova, K., et al., *A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer*. Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 16183.
107. Horackova, K., et al., *PRDMI rs2185379, unlike BRCA1, is not a prognostic marker in patients with advanced ovarian cancer*. Cancer Biomark, 2024. **40**(2): p. 199-203.
108. Zemankova, P., et al., *A deep intronic recurrent CHEK2 variant c.1009-118_1009-87delinsC affects pre-mRNA splicing and contributes to hereditary breast cancer predisposition*. Breast, 2024. **75**.
109. CZEKANCA. *CZEKANCA konsorcium*. Dostupno ke dni 2. 7. 2024; Dostupno z: <http://www.czecanca.cz/>.
110. Soukupova, J., et al., *Validation of CZEKANCA (CZEch Cancer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes*. PLoS One, 2018. **13**(4).
111. Horackova, K., et al., *Low Frequency of Cancer-Predisposition Gene Mutations in Liver Transplant Candidates with Hepatocellular Carcinoma*. Cancers 2022. **15**(1): p. 201.
112. Kral, J., et al., *Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer*. Oncol Lett, 2023. **25**(6): p. 216.
113. Kleiblova, P., et al., *Parallel DNA/RNA NGS Using an Identical Target Enrichment Panel in the Analysis of Hereditary Cancer Predisposition*. Folia Biol, 2024. **70**(1): p. 62-73.
114. Wang, S., et al., *SpecHLA enables full-resolution HLA typing from sequencing data*. Cell Rep Methods, 2023. **3**(9).
115. Liao, Y., et al., *WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(W1): p. W199-W205.
116. CRAN. *The Comprehensive R Archive Network*. Dostupno ke dni 19. 7. 2024; Dostupno z: <https://cran.r-project.org/>.
117. Terry M. Therneau, P.M.G., *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. 2000, New York: Springer.
118. Kleiblova, P., et al., *Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer*. Int J Cancer, 2019. **145**(7): p. 1782-1797.
119. Flaum, N., et al., *MSH2 is the very young onset ovarian cancer predisposition gene, not BRCA1*. J Med Genet, 2023. **60**(6): p. 576-577.
120. Herold, N., et al., *Pathogenic germline variants in SMARCA4 and further cancer predisposition genes in early onset ovarian cancer*. Cancer Med, 2023. **12**(14): p. 15256-15260.
121. Felicio, P.S., et al., *Whole-exome sequencing of non-BRCA1/BRCA2 mutation carrier cases at high-risk for hereditary breast/ovarian cancer*. Hum Mutat, 2021. **42**(3): p. 290-299.
122. Jarhelle, E., et al., *Identifying sequence variants contributing to hereditary breast and ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 negative breast and ovarian cancer patients*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 19986.
123. Koczkowska, M., et al., *Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients*. Cancers, 2018. **10**(11).
124. Mukhtar, T.A.-O.X., et al., *Protein-truncating and rare missense variants in ATM and CHEK2 and associations with cancer in UK Biobank whole-exome sequence data*. J Med Genet, 2024.
125. Bolton, K.L., et al., *Common variants at 19p13 are associated with susceptibility to ovarian cancer*. Nat Genet, 2010. **42**(10): p. 880-4.

126. Goode, E.L., et al., *A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24*. Nat Genet, 2010. **42**(10): p. 874-9.
127. Permeth-Wey, J., et al., *Identification and molecular characterization of a new ovarian cancer susceptibility locus at 17q21.31*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1627.
128. Pharoah, P.D., et al., *GWAS meta-analysis and replication identifies three new susceptibility loci for ovarian cancer*. Nat Genet, 2013. **45**(4): p. 362-70, 370e1-2.
129. Qing, T., et al., *Germline variant burden in cancer genes correlates with age at diagnosis and somatic mutation burden*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 2438.
130. Lo, T.H., et al., *Characterization of the Expression and Function of the C-Type Lectin Receptor CD302 in Mice and Humans Reveals a Role in Dendritic Cell Migration*. J Immunol, 2016. **197**(3): p. 885-98.
131. Bonifaz, L., et al., *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1627-38.
132. Faddaoui, A., et al., *The mannose receptor LY75 (DEC205/CD205) modulates cellular phenotype and metastatic potential of ovarian cancer cells*. Oncotarget, 2015. **7**(12): p. 14125-42.
133. Mehdi, S., et al., *LY75 Ablation Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) in Epithelial Ovarian Cancer (EOC) Cells Associated with DNA Methylation Alterations and Suppression of the Wnt/beta-Catenin Pathway*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(5).
134. Zelensky, A.N. and J.E. Gready, *The C-type lectin-like domain superfamily*. FEBS J, 2005. **272**(24): p. 6179-217.
135. Kilpivaara, O., et al., *Identification of Novel Germline Variants in Early-Onset Familial Classical Hodgkin Lymphoma with Exome Sequencing*. Blood, 2014. **124**(21): p. 4402.
136. Quiros, P.M. and G.S. Vassiliou, *Genetic Predisposition to Clonal Hematopoiesis*. Hemasphere, 2023. **7**(9).
137. Pagliuca, S., et al., *Individual HLA heterogeneity and its implications for cellular immune evasion in cancer and beyond*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 944872.
138. Gamzatova, Z., et al., *Analysis of HLA class I-II haplotype frequency and segregation in a cohort of patients with advanced stage ovarian cancer*. Tissue Antigens, 2007. **70**(3): p. 205-13.
139. Aureli, A., et al., *Breast Cancer Is Associated with Increased HLA-DRB1*11:01 and HLA-DRB1*10:01 Allele Frequency in a Population of Patients from Central Italy*. Immunol Invest, 2020. **49**(5): p. 489-497.
140. Mahmoodi, M., et al., *HLA-DRB1,-DQA1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in female patients with early onset breast cancer*. Pathol Oncol Res, 2012. **18**(1): p. 49-55.
141. Thuesen, N.H., et al., *Benchmarking freely available HLA typing algorithms across varying genes, coverages and typing resolutions*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 987655.
142. Lai, S.K., et al., *A novel framework for human leukocyte antigen (HLA) genotyping using probe capture-based targeted next-generation sequencing and computational analysis*. Comput Struct Biotechnol J, 2024. **23**: p. 1562-1571.
143. Kiyotani, K., T.H. Mai, and Y. Nakamura, *Comparison of exome-based HLA class I genotyping tools: identification of platform-specific genotyping errors*. J Hum Genet, 2017. **62**(3): p. 397-405.

144. NMDR. *Czech National Marrow Donors Registry*. Dostupno ke dni 12. 8. 2024; Dostupno z: www.allelefreqencies.net/pop6001c.asp?pop_id=3258.
145. Tsai, Y.Y., et al., *Heterozygote advantage at HLA class I and II loci and reduced risk of colorectal cancer*. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1268117.
146. Liao, W.L., et al., *Combining polygenic risk scores and human leukocyte antigen variants for personalized risk assessment of type 1 diabetes in the Taiwanese population*. *Diabetes Obes Metab*, 2023. **25**(10): p. 2928-2936.
147. Adebamowo, S.N., et al., *Genome, HLA and polygenic risk score analyses for prevalent and persistent cervical human papillomavirus (HPV) infections*. *Eur J Hum Genet*, 2024. **32**(6): p. 708-716.
148. Koch, S., et al., *Clinical utility of polygenic risk scores: a critical 2023 appraisal*. *J Community Genet*, 2023. **14**(5): p. 471-487.
149. Li, Q., et al., *PRDM1/BLIMP1 induces cancer immune evasion by modulating the USP22-SPI1-PD-L1 axis in hepatocellular carcinoma cells*. *Nat Commun*, 2022. **13**(1): p. 7677.
150. Parvez, A., et al., *PD-1 and PD-L1: architects of immune symphony and immunotherapy breakthroughs in cancer treatment*. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1296341.
151. Li, N., et al., *PRDM1 rs1010273 polymorphism is associated with overall survival of patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. *Immunol Lett*, 2019. **213**: p. 39-45.
152. Lavie, O., et al., *Fifteen-year survival of invasive epithelial ovarian cancer in women with BRCA1/2 mutations - the National Israeli Study of Ovarian Cancer*. *Gynecol Oncol*, 2019. **153**(2): p. 320-325.
153. Gaitskell, K., et al., *Ovarian cancer survival by stage, histotype, and pre-diagnostic lifestyle factors, in the prospective UK Million Women Study*. *Cancer Epidemiol*, 2022. **76**: p. 102074.
154. Plaxe, S.C., *Epidemiology of low-grade serous ovarian cancer*. *Am J Obstet Gynecol*, 2008. **198**(4).
155. Arter, Z.L., et al., *Epithelial ovarian cancer survival by race and ethnicity in an equal-access healthcare population*. *Br J Cancer*, 2024. **130**(1): p. 108-113.
156. Hari, A., et al., *Short-term survival analysis of a risk-adjusted model for ovarian cancer care*. *Gynecol Oncol*, 2024. **184**: p. 123-131.

9. Přílohy

Příloha 1: Horackova, K., Janatova, M., Kleiblova, P., Kleibl, Z. & Soukupova, J. 2023. **Early-Onset Ovarian Cancer <30 Years: What Do We Know about Its Genetic Predisposition?** *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 17020. IF₂₀₂₃ = 4,9

Příloha 2: Horackova, K., Zemankova, P., Nehasil, P., Vocka, M., Hovhannisyan, M., Matejkova, K., Janatova, M., Cerna, M., Kleiblova, P., Jelinkova, S., Stastna, B., Just, P., Dolezalova, T., Nemcova, B., Urbanova, M., Koudova, M., Hazova, J., Machackova, E., Foretova, L., Stranecky, V., Zikan, M., Kleibl, Z. & Soukupova, J. 2024. **A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer.** *Sci Rep*, 14, 16183. IF₂₀₂₃ = 3,8

Příloha 3: Zemankova, P., Cerna, M., Horackova, K., Ernst, C., Soukupova, J., Borecka, M., Blumcke, B., Cerna, L., Cerna, M., Curtisova, V., Dolezalova, T., Duskova, P., Dvorakova, L., Foretova, L., Havranek, O., Hauke, J., Hahnen, E., Hodulova, M., Hovhannisyan, M., Hruskova, L., Janatova, M., Janikova, M., Jelinkova, S., Just, P., Kosarova, M., Koudova, M., Krutilkova, V., Machackova, E., Matejkova, K., Michalovska, R., Misove, A., Nehasil, P., Nemcova, B., Novotny, J., Panczak, A., Pesek, P., Scheinost, O., Springer, D., Stastna, B., Stranecky, V., Subrt, I., Tavandzis, S., Tureckova, E., Vesela, K., Vlckova, Z., Vocka, M., Wappenschmidt, B., Zima, T., Kleibl, Z. & Kleiblova, P. 2024. **A deep intronic recurrent CHEK2 variant c.1009-118_1009-87delinsC affects pre-mRNA splicing and contributes to hereditary breast cancer predisposition.** *Breast*, 75, 103721. IF₂₀₂₃ = 5,7

Příloha 4: Horackova, K., Vocka, M., Lopatova, S., Zemankova, P., Kleibl, Z. & Soukupova, J. 2024. **PRDM1 rs2185379, unlike BRCA1, is not a prognostic marker in patients with advanced ovarian cancer.** *Cancer Biomark*, 40, 199-203. IF₂₀₂₃ = 2,2