

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



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

**Mgr. Sandra Jelínková**

**Charakterizace vrozených alterací genů podmiňujících vznik a prognózu  
dědičných forem vybraných nádorů dospělého věku**

**Characterization of germline alterations affecting genes influencing  
development and prognosis of specific adult cancers**

Disertační práce

Školitel:

Prof. MUDr. Zdeněk Kleibl 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, dne 20.02.2024

Sandra Jelínková

Podpis

**Identifikační záznam:**

JELÍNKOVÁ, Sandra. *Charakterizace vrozených alterací genů podmiňujících vznik a prognózu dědičných forem vybraných nádorů dospělého věku [Characterization of germline alterations affecting genes influencing development and prognosis of specific adult cancers]*. Praha, 2024. Počet stran 107, 4 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

**Poděkování:**

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Zdeňku Kleiblovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a zejména trpělivost. Dále chci poděkovat MUDr. Petře Kleiblové, Ph.D. za pomoc a cenné rady při práci v laboratoři. Velké díky patří všem kolegům z laboratoře onkogenetiky za podporu, pomoc a příjemně strávený čas v laboratoři a to zejména Mgr. Zuzaně Volkové, RNDr. Janu Královi, Ph.D., Mgr. Petře Zemánkové, Ph.D. a Ing. Martě Černé. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině za pomoc a podporu během celého postgraduálního studia.

Výzkum dědičných predispozic ke karcinomu endometria, ovaria, hepatocelulárního karcinomu byl podpořen granty Ministerstva zdravotnictví (NV16-30954A, NV18-03-00024, NV19-03-00279, 16-29959A, NV17-32030A, NV18-03-00024, NU20-03-00285, RVO-VFN 64165, DRO-MMCI 00109805, NU20-03-00283, RVO-IKEM 00023001), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (BBMRI-CZ LM2023033, LM2023067 a LX22NPO05102), Univerzity Karlovy (GAUK902120), institucionálními programy Univerzity Karlovy (SVV260516, PROGRES Q28/LF1, COOPERATIO) a projekty Akademie věd České republiky (Strategie AV21).

## Abstrakt

Ve své disertační práci jsem se věnovala studiu genetické predispozice vybraných nádorových onemocnění, jejíž příčiny nebyly v ČR dosud systematicky studovány.

Pro identifikaci dědičných patogenních variant jsme použili panelové sekvenování nové generace. Analýza 1333 pacientek s karcinomem ovaria, 527 pacientek s nádory endometria a 334 pacientů s hepatocelulárním karcinomem zahrnovala sekvenování s využitím panelu CZECANCA. Pro analýzu 264 pacientů s melanomem jsme připravili specifický panel CZMELAC. Primárně jsme se zaměřili na identifikaci nosičů patogenních variant ve známých predispozičních genech pro jednotlivá onemocnění, následně jsme hodnotili i vliv kandidátních genů a charakteristiky odlišujících nosiče patogenních variant od nenosičů.

Analýza vysoce rizikových pacientů s melanomem odhalila patogenní varianty v genech asociovaných s melanomem u 9/264 (3,4 %) nemocných, dalších 22 (8,3 %) pacientů neslo patogenní variantu v některém z dalších predispozičních genů. Pravděpodobnost záchytu patogenní varianty zvyšoval mnohočetný výskyt melanomu u probanda a výskyt onemocnění v rodině. Zcela nejčastější byl výskyt germinálních patogenních variant ve studii zaměřené na karcinom ovaria, kde jsme patogenní varianty našli u 427/1332 (32,0 %) pacientek s převahou mutací v *BRCA1*, *BRCA2*, následovaných dalšími ovariálními predispozičními geny. Nádorová duplicita karcinomu prsu a ovaria u probandek a přítomnost karcinomu ovaria v rodinné anamnéze byla nejsilnějším faktorem indikujícím přítomnost patogenní varianty, avšak i u pacientek bez pozitivní rodinné anamnézy jsme zachytili 20 % patogenních variant. Studie pacientek s karcinomem endometria identifikovala nosičky patogenních variant u 60/527 (11,4 %) případů, rozdělených přibližně stejnoměrně na nosičky alterací v genech spojených s karcinomem prsu a ovaria a nosičky mutací v genech Lynchova syndromu, u nichž jsme však zaznamenali významně vyšší riziko vzniku onemocnění v signifikantně nižším věku. Přítomnost jakéhokoliv nádorového onemocnění v rodině se vyznačovala zvýšenou pravděpodobností záchytu patogenní varianty. Analýza souboru pacientů s hepatocelulárním karcinomem zachytila přítomnost příčinné patogenní varianty v genech asociovaných s hepatocelulárním karcinomem pouze u 7/334 (2,1 %) pacientů což ukazuje, že analýza nádorové predispozice u této diagnózy není klinicky výtěžná.

Výsledky disertační práce přispěly ke zmapování nádorové predispozice studovaných nádorových onemocnění v ČR a umožnily identifikaci fenotypových charakteristik rizikových pacientů, což může přispět k lepší diagnostice a prevenci studovaných nádorových onemocnění.

**Klíčová slova:** hereditární nádorová predispozice, melanom, zhoubné nádory endometria, karcinom ovaria, hepatocelulární karcinom, panelové sekvenování, sekvenování nové generace, zárodečné varianty

## Abstract

In my dissertation, I studied the genetic predisposition of selected types of cancer that have not been systematically studied in the Czech Republic.

We used next-generation panel sequencing to identify germline pathogenic variants. Analysis of 1333 patients with ovarian cancer, 527 patients with endometrial cancer, and 334 patients with hepatocellular carcinoma included sequencing using the CZECANCA panel. A specific CZMELAC panel was prepared for the analysis of 264 melanoma patients. We focused on the identification of pathogenic variants in known predisposition genes. We also evaluated candidate genes and phenotypic characteristics in carriers of pathogenic variants.

Analysis of high-risk melanoma patients revealed pathogenic variants in melanoma-associated genes in 9/264 (3.4%) patients, and an additional 22 (8.3%) patients carried a pathogenic variant in one of the other predisposition genes. The odds of carrying a pathogenic variant were increased in probands with multiple melanomas and in the presence of melanoma in relatives. The incidence of germline pathogenic variants was highest in ovarian cancer, where pathogenic variants were found in 427/1332 (32.0%) patients, with a predominance of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, followed by alterations in other ovarian predisposition genes. Breast and ovarian cancer tumor duplicity and the presence of a family history of ovarian cancer were the strongest factors indicating the presence of a pathogenic variant, but we also detected 20% of pathogenic variants in patients without a positive family history. In a study of patients with endometrial cancer, carriers of pathogenic variants were identified in 60/527 (11.4%) cases, divided approximately equally between carriers of alterations in genes associated with breast and ovarian cancer and carriers of pathogenic variants in Lynch syndrome genes, which have a significantly higher risk of endometrial cancer at a significantly younger age. The presence of any cancer in the family was associated with an increased probability to carry a pathogenic variant. Analysis of patients with hepatocellular carcinoma detected the presence of a pathogenic variant in hepatocellular carcinoma-associated genes in only 7/334 (2.1%) patients, indicating that analysis of tumor predisposition is not clinically informative in this diagnosis.

The results of this work contributed to the mapping of tumor predisposition in the studied cancers in the Czech Republic and the identification of phenotypic characteristics of high-risk patients, which may contribute to their improved diagnostics and prevention.

**Key words:** hereditary cancer predisposition, melanoma, endometrial cancer, ovarian cancer, hepatocellular cancer, panel sequencing, next generation sequencing, germline variants



# Obsah

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | Teoretický úvod.....  | 12 |
| 1.1.   | Dědičná nádorová onemocnění .....                                       | 12 |
| 1.2.   | Epidemiologie a charakteristika studovaných nádorových onemocnění ..... | 14 |
| 1.2.1. | Melanom .....   | 14 |
| 1.2.2. | Nádory endometria.....  | 20 |
| 1.2.3. | Karcinom ovaria.....  | 25 |
| 1.2.4. | Hepatoceulární karcinom .....   | 30 |
| 2.     | Cíle práce.....   | 33 |
| 3.     | Metody.....   | 34 |
| 3.1.   | Soubor testovaných pacientů a kontrol .....                             | 34 |
| 3.1.1. | Soubor pacientů s melanomem .....                                       | 34 |
| 3.1.2. | Soubor pacientek s karcinomem endometria.....                           | 35 |
| 3.1.3. | Soubor pacientek s karcinomem ovaria.....                               | 38 |
| 3.1.4. | Soubor pacientů s hepatocelulárním karcinomem.....                      | 39 |
| 3.1.5. | Soubor kontrol.....   | 40 |
| 3.2.   | Izolace DNA z periferní krve .....                                      | 40 |
| 3.3.   | Sekvenování nové generace .....   | 40 |
| 3.3.1. | Sekvenační panel CZECANCA .....   | 41 |
| 3.3.2. | Sekvenační panel CZMELAC.....   | 41 |
| 3.3.3. | Příprava NGS knihovny .....   | 41 |
| 3.4.   | Analýza sestřihových variant .....                                      | 42 |
| 3.5.   | Bioinformatické zpracování .....  | 42 |
| 3.6.   | Statistické zpracování.....   | 43 |
| 3.7.   | Analýza dat.....  | 43 |
| 3.7.1. | Skupiny genů pro melanom .....  | 43 |
| 3.7.2. | Skupiny genů pro karcinom endometria .....                              | 44 |
| 3.7.3. | Skupiny genů pro karcinom ovaria .....                                  | 44 |
| 3.7.4. | Skupiny genů pro hepatocelulární karcinom .....                         | 45 |
| 3.7.5. | Prioritizace variant .....  | 45 |
| 3.8.   | Potvrzení přítomností genetických variant .....                         | 46 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 4.     | Výsledky.....  | 47  |
| 4.1.   | Identifikace zárodečných variant u pacientů s melanomem.....                       | 47  |
| 4.1.1. | Mutace ve vysoce až středně rizikových genech pro melanom .....                    | 50  |
| 4.1.2. | Mutace v genech s nízkým rizikem pro vznik melanomu .....                          | 51  |
| 4.1.3. | Mutace v genech asociovaných s dalšími hereditárními onemocněními.....             | 52  |
| 4.1.4. | Mutace v ostatních genech s neznámým rizikem pro vznik melanomu .....              | 52  |
| 4.1.5. | Klinicko-patologické charakteristiky pacientů s melanomem.....                     | 53  |
| 4.2.   | Analýza nádorové predispozice u pacientek s karcinomem endometria .....            | 56  |
| 4.2.1. | Zárodečné patogenní varianty v predispozičních genech pro tumory endometria ....   | 56  |
| 4.2.2. | Indikační kritéria pro identifikaci nosiček patogenních variant .....              | 58  |
| 4.2.3. | Zárodečné patogenní varianty v ostatních kandidátních genech .....                 | 59  |
| 4.2.4. | Klinicko-patologická charakteristika u nosičů patogenních zárodečných variant..... | 59  |
| 4.3.   | Analýza nádorové predispozice u pacientek s karcinomem ovaria .....                | 61  |
| 4.3.1. | Mutace v predispozičních genech pro karcinom prsu a ovaria .....                   | 61  |
| 4.3.2. | Klinicko-patologické charakteristiky pacientek s karcinomem ovaria.....            | 63  |
| 4.3.3. | Mutace v ostatních 201 analyzovaných genech .....                                  | 65  |
| 4.4.   | Identifikace zárodečných variant u pacientů s hepatocelulárním karcinomem .....    | 67  |
| 4.4.1. | Zárodečné varianty v nádorových predispozičních genech.....                        | 67  |
| 4.4.2. | Klinická charakterizace nosičů patogenních variant .....                           | 70  |
| 5.     | Diskuse .....  | 71  |
| 5.1.   | Melanom .....  | 71  |
| 5.2.   | Karcinom endometria.....   | 74  |
| 5.3.   | Karcinom ovaria.....   | 78  |
| 5.4.   | Hepatocelulární karcinom .....   | 81  |
| 6.     | Závěr.....   | 84  |
| 7.     | Seznam použitých zkratk .....  | 86  |
| 8.     | Seznam použité literatury .....  | 88  |
|        | Přílohy .....  | 107 |



# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Dědičná nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Zhoubné nádorové onemocnění vyvine každoročně 84 591 osob a 27 717 osob na tuto diagnózu zemře (ÚZIS, 2021).

Aby se běžná buňka v organismu stala nádorovou, musí dojít k maligní transformaci, buňka musí překonat bariéry kontrolních mechanismů a získat charakteristické vlastnosti nádorových buněk. Hanahan a Weinberg v roce 2000 uspořádali definici hlavních charakteristik karcinogeneze – „Hallmarks of cancer“ - na základě defektů genetických a molekulárně biologických dějů. V pozdějších publikacích tyto charakteristiky rozšířili ještě o další určující vlastnosti (Hanahan and Weinberg, 2000, Hanahan and Weinberg, 2011, Hanahan, 2022). Základním rysem nádorové buňky je její nekontrolovaný růst, který buňka podporuje úpravou signálních kaskád, tvorbou vlastních růstových faktorů a zvýšeným množstvím povrchových receptorů, tak aby dostávala neustále signál k dělení. Dalším rysem je ztráta rezpozitivity k negativním regulátorům růstu a dělení, kdy dochází k obejití kontrolních bodů buněčného cyklu jako je například kontrola integrity DNA. Projevem maligního nádoru je také rezistence k apoptóze a replikační nesmrtelnosti. Protože je pro nádorové buňky důležitý dostatečný přísun kyslíku a živin, jejich charakteristickou vlastností je také schopnost indukce tvorby nových krevních cév. Posledním z původních šesti charakteristik nádorové buňky je schopnost metastazovat do okolí, ale i do vzdálených tkání (Hanahan and Weinberg, 2000).

V roce 2011 doplnili Hanahan a Weinberg další znaky typické pro nádorovou buňku. U nádorové buňky dochází k deregulaci buněčného metabolismu, se změnou přístupu k získávání energie pomocí Warburgova jevu (jedná se o zpracování glukózy, kdy i za přítomnosti kyslíku je glukóza přeměněna na laktát). Dalším rysem nádorové buňky je inhibice imunitního systému, který je za běžných podmínek schopný identifikovat nádorové buňky a eliminovat je. Podpurným rysem je chronický zánět, který je sice projevem imunitního systému, ale přispívá k maligní transformaci, a to kvůli zvýšené koncentraci růstových faktorů v místě zánětu. Druhým podpurným rysem je nestabilita genomu, charakterizovaná poškozenou funkcí DNA reparačních drah způsobujících kumulaci somatických variant (Hanahan and Weinberg, 2011).

V posledním vydání v roce 2022 byly přidány čtyři nádorové rysy, mezi které patří fenotypová tvárnost, kdy nádorová buňka vykazuje vlastnosti progenitorových buněk, změny mikrobiomu, epigenetické změny, a změna ve vývoji senescence a nové funkce (nádorových) senescentních buněk (Hanahan, 2022).

Většina nádorových onemocnění jsou tzv. sporadická nádorová onemocnění (90-95 % případů), která vznikají na základě somatických mutací v genomové DNA získaných v průběhu života (Bertram, 2000). Proces kancerogeneze katalyzují aktivační mutace protoonkogenů (genů kódujících proteiny odpovědné za zvýšenou proliferaci a inhibici apoptózy v dělících se buňkách) a inaktivační mutace tumor supresorových genů (jejichž proteinové produkty regulující uvedené děje opačně, nebo kódují bílkoviny, které se podílejí na opravách DNA a odpovědi buňky na přítomnost poškození genomu).

Malou, ale klinicky významnou část (5-10 %) zhoubných nádorů tvoří dědičná nádorová onemocnění vznikající v důsledku přítomnosti germinální patogenní varianty v některém z několika stovek doposud známých nádorových predispozičních genů (Kulkarni and Carley, 2016, Rahman, 2014). Klinický význam dědičných nádorů zvyšují jejich typické charakteristiky, mezi kterými dominuje časný nástup nemoci (např. karcinom prsu u ženy ve věku kolem 35. roku života), opakovaný či vícenásobný výskyt onkologického onemocnění u nosiče patogenní mutace a vysoký výskyt nádorových onemocnění v rodině (Kulkarni and Carley, 2016, Kleibl and Kristensen, 2016). Identifikace příčinné genetické změny je nezbytným předpokladem pro zařazení asymptomatického jedince do preventivních programů, jejichž cílem je snížení či eliminování rizika vzniku nádorového onemocnění. V indikovaných případech (závažná kancerofobie) lze i u nosičů patogenních variant ve vysoce penetrantních genech využít preimplantační genetickou diagnostiku, jako metodu primární prevence s eliminací nádorové vlohy. Metoda využívá *in vitro* fertilizaci (IVF), kdy dochází k testování DNA v časně fázi embryogeneze, díky čemuž se může pro transfer použít embryo, které danou abnormalitu nenese (Huttelova *et al.*, 2009).

Pravděpodobnost, s jakou nosič patogenní varianty v nádorově predispozičním genu vyvine dané nádorové onemocnění se označuje jako penetrance. Nosičství mutace v nádorově predispozičních genech není, až na vzácné výjimky, spojeno se 100% pravděpodobností vzniku onemocnění. Na základě míry zvýšení rizika se nádorově predispoziční geny rozdělují do skupin genů s vysokou, střední a nízkou penetrancí, kde v tomto pořadí klesá i jejich klinický význam (Foulkes, 2008, Stratton and Rahman, 2008).

## 1.2. Epidemiologie a charakteristika studovaných nádorových onemocnění

### 1.2.1. Melanom

Melanom je maligní novotvar melanocytů, které se nachází v bazální vrstvě epidermis. Melanocyty obsahují specifické organely – melanosomy – produkující melaniny, pigmenty zodpovědné za barvu kůže, vlasů, rohovky a řady dalších tělních struktur (Liu and Sheikh, 2014). Prekursorem melaninu je tyrosin, který je pomocí tyrozináz (TYRP) metabolizován na dopa a dopachinon, které jsou dále přeměněny na hnědočerný eumelanin či žlutočerný feomelanin (Slominski et al., 2022). Melanogeneze zahrnuje také přítomnost specifických kanálů v melanocyту pro udržování pH melanosomu a transport tyrosinu (SLC45A2 a OCA2) (Le et al., 2020). Charakteristickou známkou melanocytů je přítomnost receptoru pro melanokrotin (MC1R), který stimuluje vývoj a dediferenciaci melanocytů (Kawakami and Fisher, 2017)

Melanom nejčastěji postihuje kůži (kožní melanom), vzácněji se může vyskytovat v dalších lokalizacích, jako jsou sliznice (slizniční melanom) nebo struktury oka (oční melanom). Incidence melanomu v posledních letech roste, přičemž nejvíce melanom postihuje europoidní rasu (a to zejména v Austrálii, Novém Zélandu a USA), což naznačuje fotoprotektivní funkci melaninů v kůži (Sung *et al.*, 2021).

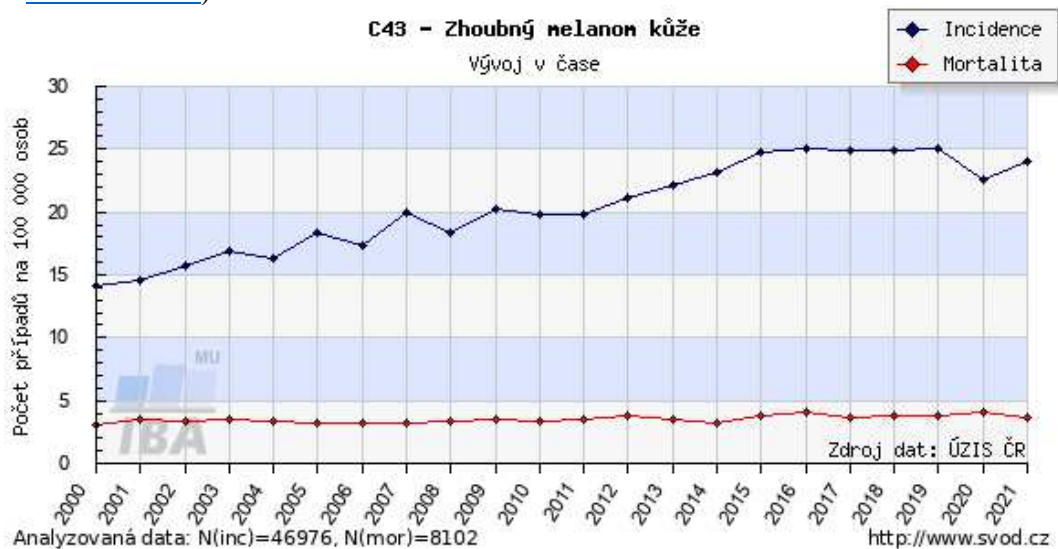
#### 1.2.1.1. Epidemiologie melanomu a charakteristika onemocnění

Incidence melanomu celosvětově narůstá, dosahuje 3,8/100 000 u mužů a 3,0/100 000 u žen (Sung *et al.*, 2021). Maligní melanom je šesté nejčastější nádorové onemocnění v naší populaci. V posledních letech byl zaznamenán výrazně rostoucí trend incidence onemocnění (z 14,2/100 000 pacientů v roce 2000 na stávajících 24,1/100 000 v roce 2021; viz **obrázek 1**, data [www.svod.cz](http://www.svod.cz)). Na rozdíl od incidence mortalita zůstává přibližně stejná (3,07/100 000 pacientů v roce 2000 a 3,68/100 000 v roce 2021, viz **obrázek 1**; data [www.svod.cz](http://www.svod.cz)).

Pro správnou prognózu nemocného je zásadní diagnóza melanomu a jeho klinické posouzení, které se často provádí pomocí tzv. „pravidla ABCDEF“. Kde A (asymmetry) označuje asymetrii, B (border irregularity) nepravidelný okraj, C (color variation) barevné odchylky, D (diameter) průměr větší než 6 mm, E (evolving) vývoj léze (zvětšení či tvarová

změna léze) a F (funny looking mole) představuje „ložisko ošklivého káčátka“ označující pigmentové ložisko nápadně se odlišující od ostatních névů postiženého jedince (Daniel Jensen and Elewski, 2015, Gaudy-Marqueste *et al.*, 2017).

**Obrázek 1.** Incidence a mortalita melanomu v České republice (obrázek dostupný z [www.svod.cz](http://www.svod.cz)).

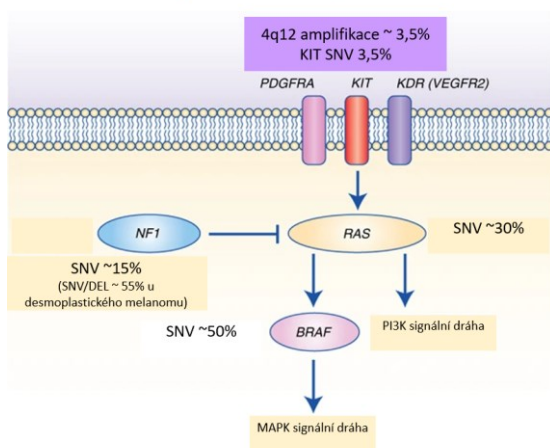


Nejběžnější formy kožního melanomu tvoří povrchově se šířící melanom (70 % případů), nodulární melanom (15-30 % případů), lentigo maligna a akrální lentiginózní melanom (méně než 10 % případů) (Schadendorf *et al.*, 2015, Liu and Sheikh, 2014). Staging melanomu je založen na Clarkově stupnici hodnocení hloubky invaze (penetrace do různých vrstev kůže) a Breslowově stupnici hodnotící tloušťku léze v kůži. Klasifikační systém TNM (Tumor, Node, Metastases) popisuje patologický staging onemocnění a jeho lokální šíření do lymfatických uzlin a systémovou diseminaci do tkání. Systém označení klinického stádia (stádium 0 až 4) spojuje informace o hloubce léze a TNM klasifikaci. Stádium 0 znamená lokální onemocnění bez šíření do okolních struktur, zatímco stádium 4 označuje onemocnění s rozšířením do lymfatických uzlin a přítomnost vzdálených metastáz (Liu and Sheikh, 2014).

Na základě analýzy genové exprese můžeme melanom rozdělit do čtyř skupin na akrální melanom (vyskytuje se například v nehtových lůžkách), slizniční melanom (nosní a ústní dutina), melanom kůže bez chronického solárního poškození (například trup a paže) a melanom kůže s chronickým solárním poškozením (například obličej). Tyto skupiny se od

sebe liší jak spektrem chromozomových změn, tak i frekvencí mutací v jednotlivých genech (Curtin *et al.*, 2005).

Další klasifikace melanomů je rozdělena na základě mutací v genech podle mezinárodní skupiny The Cancer Genome Atlas Network, která definuje čtyři typy melanomu na základě přítomnosti mutací v *BRAF* (více než 50 % případů), *RAS*, *NF1* a (nejméně častý) tzv. triple wild type (bez mutací v uvedených genech) (Cancer Genome Atlas, 2015, Curtin *et al.*, 2005). Mutace v *BRAF* a *NRAS* se v nádoru nikdy nevyskytují společně, pravděpodobně proto, že mají identický biologický efekt – tím je aktivace MAPK signální dráhy (kaskády RAS-RAF-MEK-ERK) kritické pro růst většiny melanomů. Po aktivaci Ras dojde k dimerizaci a aktivaci BRAF. Aktivovaná kináza BRAF fosforyluje a aktivuje MEK, která fosforyluje a aktivuje kinázu ERK (Melis *et al.*, 2017). Nejčastější aktivační mutací v *BRAF* (přes 80 %) je záměna aminokyseliny v exonu 15 p.V600E (vyskytuje se zde i p.V600K a p.V600R). U melanomu se z rodiny *RAS* genů nejčastěji vyskytují mutace v genu *NRAS*, a to konkrétně p.Q61R a p.Q61K, zatímco mutace v *HRAS* a *KRAS* jsou vzácné (Goydos *et al.*, 2005). Tumor supresorový gen *NF1* kóduje GAP (GTPase-activating protein), který stimuluje nízkou vlastní GTPasovou aktivitu RAS proteinů. Inaktivace *NF1* se tak podílí na hyperaktivaci kanonické MAPK signální dráhy (obrázek 2) (Ballester *et al.*, 1990).



**Obrázek 2.** V obrázku jsou uvedeny přibližné frekvence jednonukleotidových variant (SNV) v *BRAF*, *RAS* a *NF1*. Upraveno a převzato z (Rajkumar and Watson, 2016)

Prognózu onemocnění pacientů s melanomem s mutací v genu *BRAF* p.V600E výrazně zlepšila možnost nasazení cílené terapie *BRAF* inhibitorů (například dabrafenib, trametinib či vemurafenib) (Ryska *et al.*, 2017, Liu and Sheikh, 2014). Léčbu pomocí *BRAF* inhibitorů je možno s výhodou kombinovat i s imunoterapií (ipilimumab nebo nivolumab) (Ryska *et al.*, 2017, Hu-Lieskovan *et al.*, 2015).



### 1.2.1.2. Rizikové faktory

Ve vývoji kožního melanomu hrají důležitou roli environmentální a genetické rizikové faktory (Conforti and Zalaudek, 2021). Mezi rizikové faktory vzniku melanomu patří vystavení ultrafialovému (UV) záření, dále množství, typ a uspořádání kožního melaninu a výskyt atypických névů (Shain and Bastian, 2016).

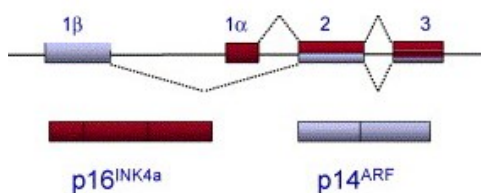
Zásadní roli u vzniku melanomu hraje expozice slunečnímu záření, respektive UV záření (nejnebezpečnější je složka UVA). U bělochů se světlou barvou kůže (fototyp I a II), se melanom vyskytuje nejčastěji. Z hlediska působení UV záření na kůži můžeme melanomy rozdělit na nádory, které vznikají v důsledku poškození DNA dlouhodobým působením malých dávek slunečního záření a nádory, které vznikají po jednorázové nadlimitní expozici (po spálení kůže) (Whiteman *et al.*, 2003, Beral and Robinson, 1981). Dalším rizikovým faktorem je výskyt atypických névů. Névy jsou nezhoubné léze, které jsou tvořené koncentrovaným množstvím melanocytů projevujících se jako tmavé pigmentové skvrny. Běžně névy vznikají v prvních dvou dekadách života. Zatímco atypické névy vznikají v pozdějším věku. Změna tvaru, barvy či struktury névu (viz pravidlo ABCDEF zmíněné na straně 14) indikuje vznik melanomu (Shain and Bastian, 2016).

### 1.2.1.3. Familiární formy maligního melanomu

Podíl familiárního melanomu je přibližně 5-10 % ze všech maligních melanomů (Hawkes *et al.*, 2016). Přestože byly identifikovány predisponující geny pro melanom, ne všechny případy familiárního melanomu mohou být spojeny s patogenními zárodečnými variantami a tak genetický základ zůstává ve velkém počtu rodin neznámý (Zocchi *et al.*, 2021).

Pravděpodobně nejdůležitějším predispozičním genem pro melanom je *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), který je lokalizován na chromozomu 9p21 (Cannon-Albright *et al.*, 1992), kde kóduje dva transkripty  $p16^{\text{INK4a}}$  a  $p14^{\text{ARF}}$  s částečně se překrývajícími čtecími rámci (obrázek 3) (Zhang *et al.*, 1998). Úlohou proteinu  $p16^{\text{INK4a}}$  je inhibice cyklin dependentních kináz 4 a 6 (*CDK4* a *CDK6*), zatímco úlohou  $p14^{\text{ARF}}$  je pozitivní regulace p53 (Hawkes *et al.*, 2016). Přibližně 30-40 % pacientů s hereditárním melanomem má mutaci v genu *CDKN2A* (Aoude *et al.*, 2015b), přičemž většina patogenních variant (PV) se vyskytuje v exonech 1 $\alpha$  a 2. Frekvence mutací se liší i podle geografické

oblasti, vyšší frekvence mutací se nachází v oblastech s nižším výskytem melanomu a naopak (Hill *et al.*, 2013). Zárůdečné patogenní varianty v genu *CDK4* (cyclin-dependent kinase 4) patří také mezi predispoziční varianty pro vznik melanomu a nejčastěji se vyskytují v druhém exonu, který kóduje doménu interagující s p16<sup>INK4</sup> (Hill *et al.*, 2013). Varianty v *CDK4* se však vyskytují vzácně (Zocchi *et al.*, 2021).

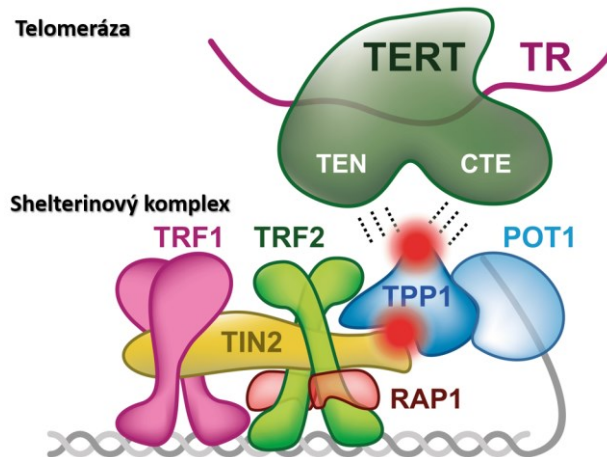


**Obrázek 3** Lokus p16<sup>INK4a</sup> a p<sup>14ARF</sup>. Na obrázku jsou zobrazeny čtecí rámce, kde každý z nich má jedinečný první exon. Převzato a upraveno z (Sharpless, 2005).

Predispoziční gen *BAP1* (*BRCA1* associated protein 1), kóduje protein účastnící se reparace DNA pomocí homologní rekombinace (Carbone *et al.*, 2013). Zárůdečné varianty v *BAP1* predisponují k hypopigmentovanému kožnímu melanomu, uveálnímu melanomu a dalším nemelanomovým nádorům (Carbone *et al.*, 2013). U některých pacientů se zárodečnými variantami v *BAP1* se vyskytuje fenotyp, kde se u těchto pacientů vyskytují atypické intradermální nádory (MBAITS), neboli „BAPomy“ (Carbone *et al.*, 2013, Hawkes *et al.*, 2016).

Geny, které kódují proteiny shelterinového komplexu, struktury obalující telomery na koncích chromozomů, *POT1*, *ACD*, *TERF1*, *TERF2*, *TINF2* a *TERF2IP* (obrázek 4), tvoří další skupinu predispozičních genů melanomu (Goldstein *et al.*, 2017). Shelterinový komplex nejen chrání konce DNA, ale také reguluje přístup enzymů, jako je telomeráza a helikáza k telomerické DNA (Aoude *et al.*, 2015a, Veverka *et al.*, 2019). Nosiči zárodečných variant v genu *POT1* (protection of telomeres 1) mají delší telomery, což je považováno za rizikový faktor pro vznik melanomu (Hawkes *et al.*, 2016). Stejně tak to bylo prokázáno i u genů *ACD* (*ACD* shelterin complex subunit and telomerase recruitment factor), *TERF2IP* (telomeric repeat-binding factor 2 - interacting protein 1) a *TERT* (telomerase reverse transcriptase), který je lokalizován na chromozomu 5 a kóduje katalytickou podjednotku telomerázy (Aoude *et al.*, 2015a, Horn *et al.*, 2013).

**Obrázek 4.** Schematický popis podjednotek telomerázy a shelterinového komplexu. TERT je katalytická podjednotka s telomerázovou N-terminální (TEN) a C-terminální prodlužovací (CTE) doménou. TR je RNA podjednotka telomerázy. Shelterinové podjednotky TRF1 (TERF1), TRF2 (TERF2) a RAP1 (TERF2IP) jsou dimery a ostatní podjednotky – TPP1 (ACD), POT1 a TIN2 (TINF2) jsou monomery. Převzato a upraveno z (Veverka et al., 2019).



Mezi predispoziční geny pro vznik melanomu můžeme zařadit i skupinu genů kódujících proteiny, které se účastní syntézy melaninu v melanocytech: *MC1R*, *MITF*, *OCA2* a *SLC45A2* (Law *et al.*, 2015). *MC1R* (melanocortin 1 receptor) kóduje receptor, který na sebe váže melanocyty stimulující hormon receptor  $\alpha$ , čímž následně aktivuje cAMP prostřednictvím adenylátcyklázy. Zvýšení cAMP podporuje produkci hnědých a černých eumelaninů před červenými/žlutými feomelaninovými pigmenty (Hawkes *et al.*, 2016). *MITF* (melanocyte inducing transcription factor) kóduje transkripční faktor s důležitou funkcí při regulaci vývoje a diferenciaci melanocytů. MITF je aktivován MC1R/cAMP dráhou za vzniku eumelaninu a patogenní varianty v tomto genu byly nalezeny jak u familiárních, tak u sporadických forem melanomu (Yokoyama *et al.*, 2011). *OCA2* (OCA2 melanosomal transmembrane protein) patří do rodiny genů způsobující okulokutánní albinismus (snížení nebo absenci syntézy melaninu v melanocytech oka a kůže). Gen *OCA2* kóduje P protein (nazývaný též melanocyte-specific transporter protein), transmembránový protein pro aktivní transport látek (např. tyrosinu) do melanosomů, což je důležité pro syntézu melaninu (Le *et al.*, 2020). *SLC45A2* (solute carrier family 45 member 2) kóduje monosacharidový (konkrétně glukózový) transportér, který se podílí na regulaci energetického metabolismu a melanogeneze, a to udržováním stálého pH melanosomu, což je nezbytné pro správnou funkci tyrozinázy, která hraje důležitou roli při syntéze melaninu (Hawkes *et al.*, 2016, Le *et al.*, 2020, Liu *et al.*, 2022). Klinický význam germinálních patogenních variant v genech

pro syntézu melaninu je však s ohledem na melanom nejasný, neboť většina variant má pouze částečnou a nejasně definovanou penetranci k tomuto onemocnění. Častěji byly varianty v těchto genech popsány v souvislosti s různými formami poruch pigmentace (Zocchi *et al.*, 2021).

## **1.2.2. Nádory endometria**

Karcinomy endometria jsou nejčastější gynekologické nádory ve vyspělých zemích (Sung *et al.*, 2021). Incidence má rostoucí tendenci pravděpodobně v důsledku prodlužující se délky života, delšího aktivního hormonálního období ženy a civilizačních chorob (Makker *et al.*, 2021).

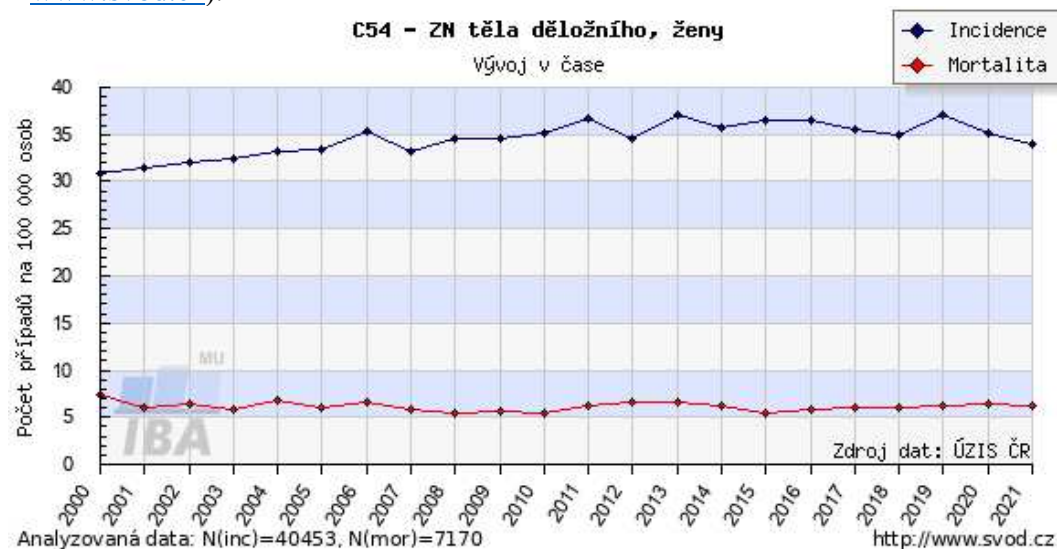
### **1.2.2.1. Epidemiologie a charakteristika nádorů endometria**

Karcinom endometria (EC) je celosvětově nejčastější gynekologický nádor a čtvrtý nejčastější nádor u žen (Sung *et al.*, 2021). V České republice incidence oproti začátku tisíciletí stoupla jen minimálně (v roce 2000 byla 30,8/100 000 obyvatel a v roce 2021 činila 33,9/100 000 obyvatel, data [www.svod.cz](http://www.svod.cz)) a mortalita (oproti karcinomu ovaria, Kapitola 1.2.3) setrvává na nízkých úrovních (7,3/100 000 obyvatel v roce 2000 na 6,2/100 000 obyvatel v roce 2021 viz **obrázek 5**; data [www.svod.cz](http://www.svod.cz)).

Z histologického hlediska asi 80 % případů zhoubných nádorů dělohy tvoří endometroidní karcinom, následuje karcinom serózní (10 %), mucinózní, světlobuněčné a smíšené adenokarcinomy. Přibližně 5 % zhoubných nádorů dělohy jsou sarkomy. Z klinického pohledu na základě prognózy onemocnění se nádory endometria dělí na dva typy, které se odlišují prognózou, histopatologickými formami i molekulárními mechanismy tumorigeneze (Makker *et al.*, 2021). Prvním typem jsou nádory asociované s působením estrogenů, kdy je endometriální sliznice citlivá na estrogení stimulaci, která poté indukuje mitózu epitelových buněk, což může přispívat k maligní transformaci. Nejčastější formou prvního typu karcinomu endometria je endometroidní karcinom (grade 1-2). Nádory prvního typu mají příznivou prognózu a pětileté přežití pacientek s těmito nádory dosahuje 81 % (Makker *et al.*, 2021). Nádory druhého typu zahrnují obvykle formy nezávislé na působení estrogenu. Nejčastějšími typy jsou serózní a světlobuněčné karcinomy a endometroidní

karcinom s vysokým gradingem (grade 3). Pětileté přežití pacientek s karcinomem endometria druhého typu je významně nižší (pod 55 %) (Makker *et al.*, 2021).

**Obrázek 5.** Incidence a mortalita nádorů endometria v ČR (obrázek dostupný z [www.svod.cz](http://www.svod.cz)).



V posledních letech bylo toto klinické dělení přehodnoceno (zejména díky pokrokům v molekulárních a sekvenčních technologiích). V roce 2013 konsorcium The Cancer Genome Atlas Network publikovalo výsledky studie rozdělující karcinom endometria do čtyř skupin na základě počtu mutací (Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2013). První skupinou jsou CNH (copy number high) nádory. Typickým rysem CNH nádorů je vysoké množství rozsáhlých duplikací či delecí a plošných genomových alterací. Většina CNH nádorů má patogenní varianty v genu *TP53*. Nádory této skupiny mají zpravidla vysoký grade a jsou agresivní, patří sem zejména serózní karcinomy a asi 25 % endometroidních karcinomů. Prognóza CNH nádorů je ze všech čtyř skupin nejhorší. Druhou skupinou jsou nádory s mikrosatelitovou nestabilitou (MSI). MSI je ukazatelem nesprávné funkce opravné dráhy, kdy dochází k opravám chybně spárovaných bází (MMR). MSI vzniká v repetitivních oblastech (opakování jednoho až šesti nukleotidů), které jsou náchylné na chybu DNA polymerázy. Geny z MMR dráhy spojené s MSI jsou *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Prognóza těchto nádorů je oproti první skupině dobrá (Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2013), a většinou se jedná o endometroidní karcinomy (Makker *et al.*, 2021). Třetí skupinou jsou nádory, u kterých došlo k somatickým mutacím v oblasti exonukleázové domény DNA polymerázy kódované genem *POLE*. *POLE* je DNA polymeráza, opravující

chyby v DNA, které vznikají během replikace, viz kap 1.2.2.4 (Ogi *et al.*, 2010). Tyto nádory představují asi 7 % všech případů karcinomu endometria a mají velice příznivou prognózu (Makker *et al.*, 2021). Poslední skupinou jsou tzv. CNL (copy number low) nádory, charakterizované nízkým výskytem genomových přestaveb. U těchto nádorů byla zaznamenána zvýšená exprese progesteronového receptoru, díky tomu by tento typ nádoru mohl dobře reagovat na hormonální terapii. Prognóza těchto nádorů je dobrá (Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2013).

Stádia onemocnění jsou charakterizována pomocí TNM klasifikace, klinická stádia za pomoci FIGO (Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique) klasifikace podle růstu a infiltrace okolních tkání. Nízká stádia (stádium I a II) jsou omezena na dělohu a pokročilá stádia (stádium III a IV) charakterizují onemocnění s invazí do okolních tkání a případných metastáz (Pecorelli, 2009).

#### **1.2.2.2. Rizikové faktory**

Faktory ovlivňující riziko vzniku karcinomu endometria zahrnují věk pacientky nad 55 let, obezitu, raný věk menarche, pozdní věk menopauzy, přítomnost diabetu mellitu II. typu, dlouhodobé vystavení endogenním i exogenním estrogenům, nuliparitu či nízkou paritu a genetické predispozice (Makker *et al.*, 2021). Dobře prostudovaným, ovlivnitelným faktorem zvyšujícím riziko karcinomu endometria je obezita. Pro ženy s body mass indexem (BMI) v rozmezí 25-30 kg/m<sup>2</sup> dosahuje relativní riziko (RR) vzniku karcinomu endometria hodnoty 1,6 a se stoupajícím BMI se zvětšuje (BMI 30-35 kg/m<sup>2</sup>: RR=2,6; BMI 35-40 kg/m<sup>2</sup>: RR=4,8; pro BMI> 40 kg/m<sup>2</sup>: RR=6,9) (Setiawan *et al.*, 2013). Obezita přispívá ke vzniku karcinomu endometria také zvýšenou syntézou estrogenů produkovaných v adipocytech tukové tkáně (Renehan *et al.*, 2015). Riziko vzniku karcinomu endometria snižuje normální hodnota BMI, zvýšená parita (Raglan *et al.*, 2019) či užívání hormonální antikoncepce, která může snižovat riziko až o 50 % (Daniels and Lu, 2016).

Naprostá většina případů karcinomu endometria je sporadického původu, zhruba 3,5 % je tvořeno dědičnými formami, nejčastěji je karcinom endometria asociován s variantami v genech Lynchova syndromu (Spurdle *et al.*, 2017).

### **1.2.2.3. Dědičné predispozice ke karcinomu endometria**

V současnosti je dědičná forma karcinomu endometria uvažována pouze v kontextu s Lynchovým syndromem (LS), autosomálně dominantním dědičným onemocněním způsobujícím nepolypózní formu dědičného karcinomu tlustého střeva. Příčinou Lynchova syndromu je přítomnost germinálních patogenních variant v genech kódujících proteiny, které se účastní oprav chybného párování bází v DNA. Karcinom endometria je po kolorektálním karcinomu druhým nejčastějším projevem Lynchova syndromu. Pravděpodobnost, že nosička patogenních mutací v genech pro Lynchův syndrom vyvine karcinom endometria jako první nádor je asi 40-60 % (Tafe *et al.*, 2014, Lu *et al.*, 2005). Celoživotní riziko (do 70 let věku) vzniku karcinomu endometria se liší pro nosičky zárodečné patogenní varianty u jednotlivých genů Lynchova syndromu. U nosiček patogenních variant v *MLH1* dosahuje riziko 18 % (9-34 %), pro *MSH2* 30 % (18-45 %), pro *MSH6* 26 % (18-36 %) a pro nosičky patogenních variant v genu *PMS2* 12-15 %. Riziko vzniku karcinomu endometria u nosiček delecí 3' oblasti genu *EPCAM* (jedná se o úsek genu, který sousedí s genem *MSH2*, delece v této části *EPCAM* mohou vést k hypermetylacii promotoru *MSH2* nebo až částečné delecii *MSH2* (Perez-Cabornero *et al.*, 2011)) dosahuje v průměru 12 % (0-27 %) (Spurdle *et al.*, 2017). Nosičky patogenních variant v genech Lynchova syndromu mají nižší věk diagnózy a nižší BMI než pacientky se sporadickým karcinomem endometria. Co se týče histologického typu je endometroidní karcinom nejčastějším typem, jak u sporadického karcinomu endometria, tak u karcinomu endometria spojeného s Lynchovým syndromem (Zhao *et al.*, 2022).

### **1.2.2.4. Další kandidátní predispoziční geny pro karcinom endometria**

Mezi kandidátní geny predisponující k vzniku karcinomu endometria řadíme *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1*, *PTEN*, *STK11* a *TP53*. Možné spojení s karcinomem endometria mají také geny *AKT1*, *APC*, *ATM*, *BRIP1*, *FAN1*, *FANCC*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *SDHB*, *SDHC* a *SDHD* (Spurdle *et al.*, 2017).

Geny *BRCA1* a *BRCA2* kódují proteiny, které se podílejí na opravě dvouřetězcových zlomů procesem homologní rekombinace. Jejich germinální mutace jsou nejčastější příčinou vzniku hereditárního karcinomu prsu a ovaria (viz kapitola 1.2.3.3). Riziko vzniku karcinomu endometria u nosiček dědičných patogenních variant nebylo doposud stanoveno

v rozsáhlých studiích, avšak například holandská studie, kde bylo analyzováno 5980 pacientek se zárodečnými mutacemi v genech *BRCA1* a *BRCA2*, prokázala, že nosičky mutací v *BRCA1* mají středně zvýšené riziko vzniku karcinomu endometria (OR=3,5; 95%CI 2,61-4,72), zatímco nosičky mutací v genu *BRCA2* riziko nízké (OR=1,7; 95%CI 1,01-2,87). Vyšší riziko k seróznímu karcinomu endometria (OR=12,6; 95%CI 7,62-20,96) bylo nalezeno u pacientek s variantami v genu *BRCA1* (de Jonge *et al.*, 2021).

*POLE* a *POLD1* kódují katalytické a opravné podjednotky DNA polymeráz  $\delta$  a  $\epsilon$ , které se účastní replikace a oprav DNA. Obě polymerázy provádí většinu replikace vedoucího a opožďujícího se řetězce DNA u eukaryot (Zhou *et al.*, 2019). *POLE* se účastní i oprav DNA jako jsou base excision repair (BER) a nucleotide excision repair (NER), stejně tak i *POLD1*, která se navíc vyskytuje i u oprav chybně spárovaných bází (MMR) (Pospiech and Syvaoja, 2003, Nicolas *et al.*, 2016). Nejčastěji byly nalezeny missense zárodečné patogenní varianty postihující exonukleázové domény *POLE* (exony 9-14) a *POLD1* (exony 8-13) (Rohlin *et al.*, 2014, Spier *et al.*, 2015, Bellido *et al.*, 2016).

*PTEN* (phosphatase and tensin homolog) je tumor supresorový gen, jehož proteinový produkt je zapojen do signální dráhy PI3K/AKT. *PTEN* defosforyluje fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát. Ztráta funkce *PTEN* proteinu tak způsobuje setrvání aktivní formy inositoltrisfosfátu na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, hyperaktivaci PI3K/AKT signalizace, což umožňuje zvýšenou proliferaci a rezistenci k indukci apoptózy. Zatímco somatické mutace v *PTEN* jsou velmi časté, vzácné dědičné patogenní varianty v *PTEN* způsobují Cowdenův syndrom, který je typický přítomností hamartomů (okrsky dysplastických buněk připomínajících maligní ložisko, které se vyskytují v různých tkáních), ale především predispozicí ke vzniku karcinomu prsu, endometria či štítné žlázy (Spurdle *et al.*, 2017). Nosiči zárodečných variant v genu *PTEN* mají kumulativní riziko karcinomu endometria do 70 let 19-28 % (Tan *et al.*, 2012) s dominantním podílem vzniku endometroidního karcinomu (Spurdle *et al.*, 2017).

Gen *MUTYH* (MutY DNA glycosylase) kóduje glykosylázu, která se účastní reparační dráhy BER. Germinální patogenní varianty v tomto genu jsou spojeny s autosomálně recesivní atenuovanou formou adenomatózní polypózy a kolorektálním karcinomem. Monoalelické zárodečné mutace mají nízké kumulativní riziko kolorektálního karcinomu (6 % pro ženy a 7 % pro muže), zatímco bialelické mutace zvyšují riziko vzniku



onemocnění mnohonásobně (72 % pro ženy a 75 % pro muže) (Win *et al.*, 2014). Riziko pro nosiče bialelických mutací v *MUTYH* není pro karcinom endometria známé (Spurdle *et al.*, 2017).

*CHEK2*, *TP53* a *STK11* jsou predispoziční geny karcinomu endometria, ale u nosiček patogenních variant v genech *CHEK2* a *STK11* není dostatek údajů pro určení rizika vzniku tohoto karcinomu (Spurdle *et al.*, 2017, Banno *et al.*, 2013). Pro gen *TP53* jsou v souvislosti s karcinomem endometria známé zejména somatické inaktivace (Nichols *et al.*, 2001).

### 1.2.3. Karcinom ovaria

Karcinom ovaria (OC) je závažné nádorové onemocnění s velkým podílem hereditárních forem. Jedná se, po karcinomu endometria, o druhý nejčastější gynekologický nádor (Sung *et al.*, 2021). Na rozdíl od něj bohužel představuje karcinom ovaria typicky pozdně diagnostikované onemocnění (nejčastěji ve stádiu III a IV), což se projevuje na mnohem méně příznivé prognóze (Horackova *et al.*, 2023).

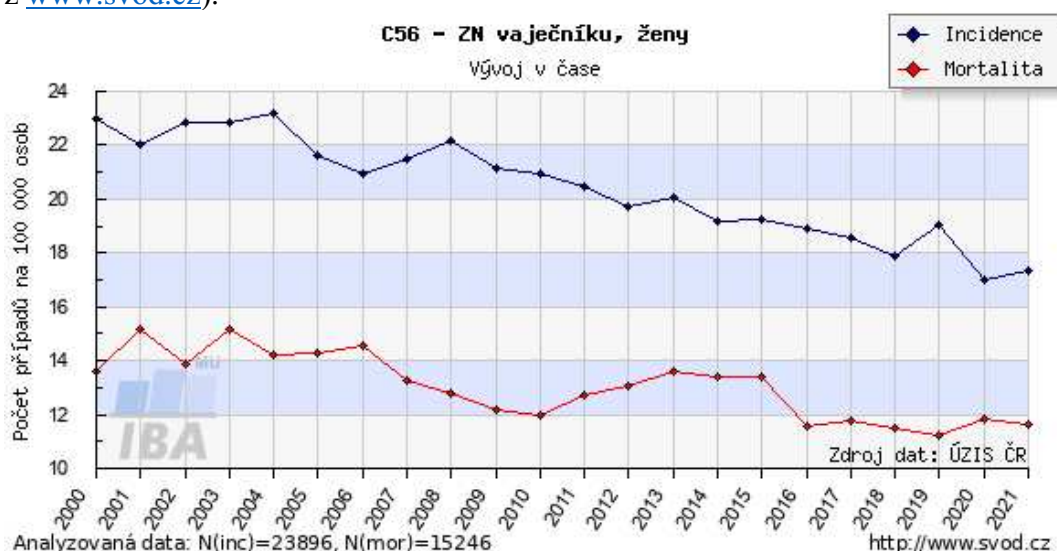
#### 1.2.3.1. Epidemiologie a charakteristika karcinomu ovaria

Celosvětově je karcinom ovaria osmý nejčastější nádor u žen (Sung *et al.*, 2021). V ČR jeho incidence oproti začátku tisíciletí rapidně klesla (v roce 2000 byla 23,0/100 000 obyvatel a v roce 2021 činila 17,3/100 000 obyvatel, data [www.svod.cz](http://www.svod.cz)). Stejně tak tomu bylo i u mortality, která se z 13,6/100 000 obyvatel (rok 2000) snížila na 11,6/100 000 obyvatel v roce 2021 (data [www.svod.cz](http://www.svod.cz)) (obrázek 6). Většina případů onemocnění je diagnostikována po 50. roce života.

Ovariální karcinom reprezentuje pestrou skupinu zahrnující nádory vejcovodů, vaječnicků a pobřišnice. Asi 90 % případů jsou nádory epiteliálního původu a zbývajících 10 % jsou neepiteliální nádory, které se skládají převážně ze zárodečných buněk. Vzácné neepiteliální ovariální nádory dospělého věku tvoří sarkomy. Epiteliální karcinomy můžeme rozdělit do pěti hlavních histologických podtypů. Prvním typem jsou high-grade serózní karcinomy (HGSC), které představují 70 % všech epiteliálních karcinomů ovaria. Následují endometroidní (10 %), světlobuněčný (přibližně 10 %), mucinózní (3 %) a low grade serózní karcinom (LGSC; 5 %) (Prat, 2012). Histopatologická klasifikace epiteliálních ovariálních

karcinomů určuje i klinický průběh onemocnění. Epiteliální karcinomy ovaria se dělí na nádory s dobrou (typ I) a špatnou prognózou (typ II). Typ I zahrnuje LGSC, světlóuněčné, či mucinózní karcinomy. Tyto nádory jsou geneticky stabilní, typicky se jedná o nádory nízkého stupně s nízkou proliferační aktivitou. Často se vyvíjí z benigních lézí nádorů vaječníků, a proto jsou tyto nádory diagnostikovány v časnějším stádiu (Matz *et al.*, 2017). Zatímco nádory se špatnou prognózou (typ II) převládají, protože zahrnují nejčastější HGSC nádory. Typ II je charakterizován častými abnormalitami v opravných drahách DNA, což může vést ke genomové nestabilitě. Tento typ je charakteristický pozdní diagnózou v pokročilých stádiích, a to zejména díky tomu, že zahrnuje nádory s vysokým proliferačním potenciálem a rychlou progresí (Morden *et al.*, 2021, Cancer Genome Atlas Research, 2011).

**Obrázek 6.** Incidence a mortalita karcinomu ovaria v České republice (obrázek dostupný z [www.svod.cz](http://www.svod.cz)).



Stádia onemocnění jsou charakterizována pomocí TNM klasifikace a klinická stádia klasifikací FIGO.

### 1.2.3.2. Rizikové faktory

Celoživotní riziko ovariálního karcinomu (OC) je ve vyspělých zemích asi 1,1 % (Horackova *et al.*, 2023) a je pozitivně spojeno s celoživotními ovulačními roky a paritou (Fu *et al.*, 2023). Dalšími rizikovými faktory jsou věk či používání postmenopauzální

hormonální terapie (Matulonis *et al.*, 2016). Hormonální substituční léčba ukázala zvýšení rizika vývoje karcinomu ovaria u post-menopauzálních žen. U žen, které užívaly estrogení substituční léčbu, bylo riziko zvýšeno o 22 %, zatímco u žen s kombinovanou (estrogení a progesteronovou) léčbou o 10 % (Pearce *et al.*, 2009). Nicméně bylo prokázáno i stejné zvýšení rizika vzniku ovariálního karcinomu (konkrétně serózního nebo endometroidního karcinomu) u žen v menopauze, které užívaly hormonální substituční terapii (ať už kombinovanou nebo pouze estrogení) (Matulonis *et al.*, 2016). Relativní riziko rozvoje karcinomu ovaria se může až třikrát zvýšit v případě pozitivní rodinné anamnézy, která je u pacientek s karcinomem ovaria nejvýznamnějším rizikovým faktorem (Pavanello *et al.*, 2020).

### **1.2.3.3. Dědičné predispozice ke karcinomu ovaria**

Karcinom ovaria je součástí syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria. Podle aktuálního doporučení NCCN Guidelines (Version 1.2023) (dostupné z [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_bop.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf)) můžeme predispoziční geny rozdělit na geny s prokázaným zvýšením rizika – *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* a geny s možným zvýšením rizika – *ATM*, *BARD1*, *NBN*, a *PALB2*.

*BRCA1* (breast cancer 1) a *BRCA2* (breast cancer 2) jsou hlavními predispozičními geny dědičného karcinomu prsu a ovaria. *BRCA1* je lokalizovaný na chromozomu 17q21.31 (Miki *et al.*, 1994) a *BRCA2* na chromozomu 13q13.1 (Wooster *et al.*, 1995). Proteinové produkty těchto genů hrají důležitou roli při opravě dvouřetězcových zlomů DNA (pomocí homologní rekombinace, **obrázek 7**) (Nielsen *et al.*, 2016). Zárodečné patogenní varianty v genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou nalezeny u 20 % pacientek s karcinomem ovaria (Toss *et al.*, 2015). Riziko vzniku karcinomu ovaria pro *BRCA1* a *BRCA2* nosičky se signifikantně zvyšuje od věku 35 až 45 let - 58 % pro *BRCA1* a 15 % pro *BRCA2* (Lilyquist *et al.*, 2017). Průměrný věk pacientek s karcinomem ovaria je signifikantně nižší u nosiček patogenních variant v *BRCA1* (53 let) v porovnání s nosičkami *BRCA2* (59 let) (Chen *et al.*, 2020). Patogenní varianty v genech *BRCA* zvyšují riziko i jiných nádorů – karcinomu prsu (*BRCA1* a *BRCA2*), karcinomu pankreatu (*BRCA2*) a karcinomu prostaty (*BRCA2*). Většina epiteliálních ovariálních karcinomů je asociována se zárodečnými patogenními variantami

v *BRCA1/2*, přičemž právě tyto mutace jsou nejčastěji u HGSC nádorů (Pennington and Swisher, 2012, Matulonis *et al.*, 2016).

Významné riziko vzniku karcinomu ovaria je spojeno i se zárodečnými patogenními variantami v genech *RAD51C* a *RAD51D*. *RAD51C* (RAD51 paralog C) je lokalizován na chromozomu 17q23 (Takata *et al.*, 2001) a podílí se na homologní rekombinaci (obrázek 7) (Badie *et al.*, 2009). *RAD51D* (RAD51 paralog D) je lokalizován na chromozomu 17q12 a jeho proteinový produkt se váže do komplexu s proteinem XRCC3 (Masson *et al.*, 2001), který se také účastní homologní rekombinace (Kurumizaka *et al.*, 2002). U nosičů patogenních variant v těchto genech je celoživotní riziko epiteliálního karcinomu ovaria 15 % pro *RAD51C* a 20 % pro *RAD51D* (Lilyquist *et al.*, 2017). Průměrný věk diagnózy karcinomu ovaria je u nosiček patogenních variant v těchto genech 57 let pro *RAD51D* a 62 let pro *RAD51C* (Cummings *et al.*, 2021).

*BRIP1* (BRCA1 interacting helicase 1) byl objeven jako interakční partner proteinu BRCA1 a je lokalizován na chromozomu 17q22. Podílí se na homologní rekombinaci (obrázek 7) a na udržování genomové integrity (London *et al.*, 2008). Riziko vzniku epiteliálního karcinomu ovaria u nosiček patogenních variant v *BRIP1* dosahuje 15 % a průměrný věk diagnózy karcinomu ovaria je u nosiček patogenních variant v *BRIP1* 65 let (Weber-Lassalle *et al.*, 2018).

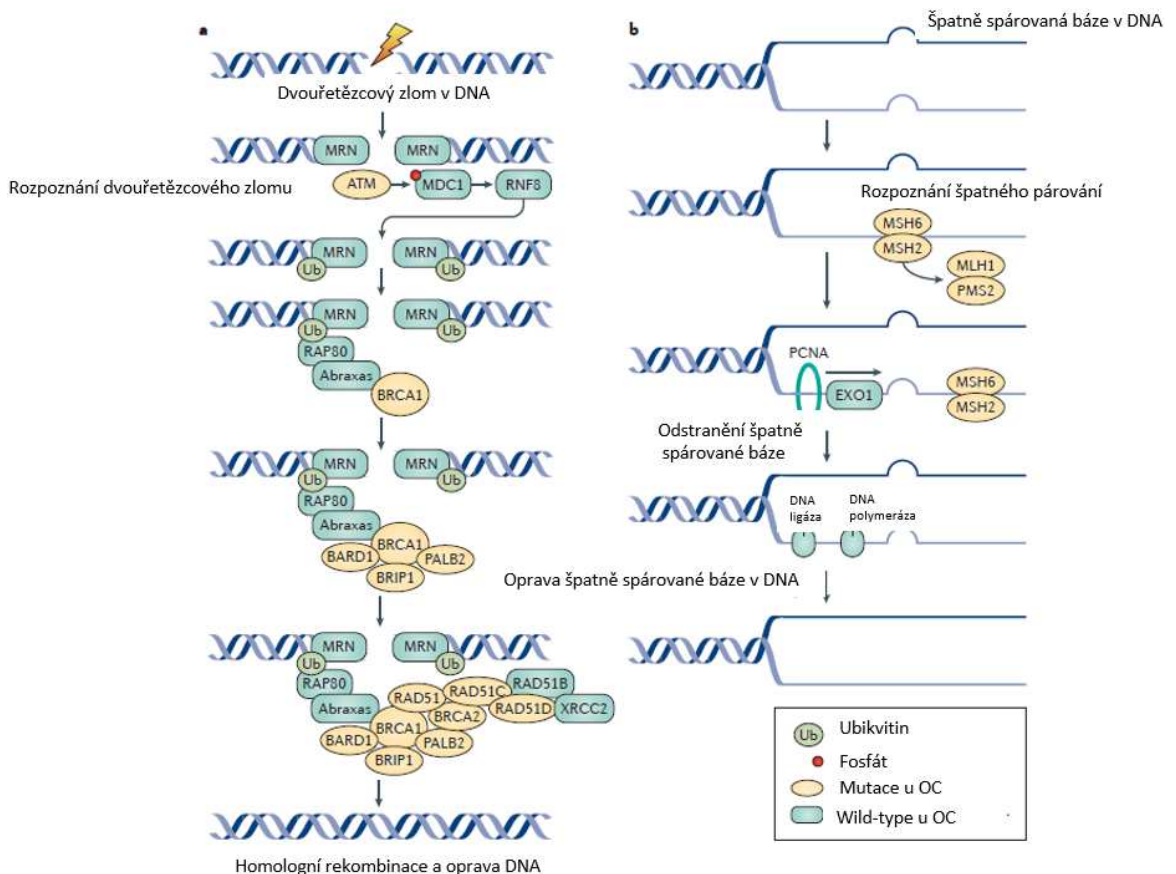
*MLH1*, *MSH2* a *MSH6* jsou geny, jejichž produkty se podílejí na opravách chybně spárovaných bází (MMR, obrázek 7) a jsou asociovány s Lynchovým syndromem (Barrow *et al.*, 2013). Karcinomy ovaria u pacientek s Lynchovým syndromem jsou nejčastěji endometroidního typu a často vznikají v nižším věku – průměrný věk vzniku ovariálního karcinomu u nosiček patogenních variant je 43 let pro *MSH2* a 46 let pro *MLH1* (Bernards *et al.*, 2016, Curtius *et al.*, 2022). Pro *MSH6* je riziko vzniku epiteliálního karcinomu ovaria pouze několik procent, zatímco pro *MLH1* je více než 20 % a pro *MSH2* dosahuje 38 % (Dominguez-Valentin *et al.*, 2018).

Gen *STK11* (serine/threonine kinase 11) je lokalizován na chromozomu 19p13 a kóduje kinázu, která se podílí na určení polarity buňky a regulaci energetického metabolismu a tím i na udržování energetické homeostázy (Xu *et al.*, 2013). Mutace v tomto genu jsou asociovány s Peutz-Jeghersovým syndromem, který je spojený se skupinou hereditárních nádorových onemocnění (karcinom prsu a karcinom gastrointestinálního traktu) a je charakterizován výskytem kožních a slizničních hyperpigmentací (Beggs *et al.*,

2010). Nejčastěji jsou patogenní zárodečné mutace v *STK11* spojeny s neepiteliálním karcinomem ovaria. Riziko vzniku je větší než 10 % a nádory často vznikají v mladém věku (<30 let) (Hearle *et al.*, 2006, Giardiello *et al.*, 2000, Klimkowski *et al.*, 2021).

*ATM*, *BARD1*, *NBN* a *PALB2* patří mezi geny s možným rizikem vzniku karcinomu ovaria. *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) a *PALB2* (partner and localizer of BRCA2) mají klíčovou roli v iniciaci oprav dvouřetězcových zlomů pomocí homologní rekombinace (obrázek 7) (Nielsen *et al.*, 2016). *ATM* a *PALB2* jsou spojeny se středním rizikem pozdního nástupu epitheliálního karcinomu ovaria (Kurian *et al.*, 2017). *NBN* kóduje protein nibrin, který je součástí komplexu MRE11-RAD50-NBN (Otahalova *et al.*, 2023). Tento komplex se podílí na rozpoznání dvouřetězcových zlomů a iniciuje jejich opravu (Villa *et al.*, 2016).

**Obrázek 7.** a. Oprava dvouřetězcových zlomů pomocí homologní rekombinace. b. oprava chybně spárovaných bází v DNA. Převzato a upraveno z (Matulonis *et al.*, 2016).



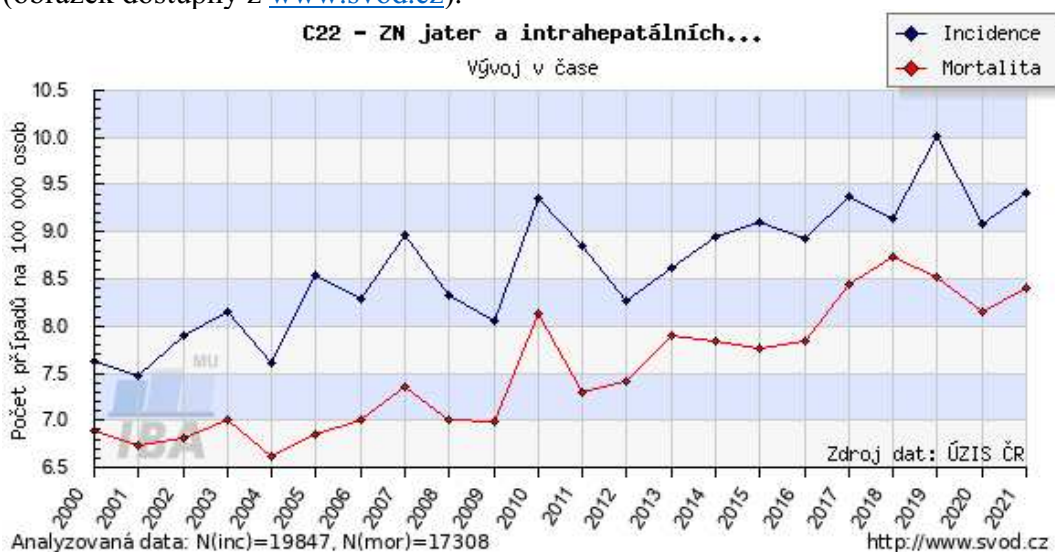
## 1.2.4. Hepatocelulární karcinom

Hepatocelulární karcinom (HCC) je nejčastější maligní nádor jater. Jeho vznik je úzce spjat především s chronickým jaterním onemocněním – cirhózou či chronickou hepatitidou. Incidence hepatocelulárního karcinomu v posledních letech celosvětově roste (Sung *et al.*, 2021, Llovet *et al.*, 2021).

### 1.2.4.1. Epidemiologie a charakteristika hepatocelulárního karcinomu

Hepatocelulární karcinom (HCC) je celosvětově šestým nejčastějším diagnostikovaným nádorem a třetí nejčastější příčinou úmrtí z hlediska nádorových onemocnění (Sung *et al.*, 2021). Jeho výskyt stoupá s věkem a vrcholí kolem 70. roku života, nicméně výrazně nižší věk diagnózy je u čínské a africké černošské populace. U mužů se hepatocelulární karcinom vyskytuje až 2,5× častěji než u žen (Sung *et al.*, 2021). V České republice incidence oproti začátku tisíciletí mírně roste (v roce 2000 byla 7,62/100 000 obyvatel, zatímco v roce 2021 činila 9,41/100 000 obyvatel, data [www.svod.cz](http://www.svod.cz)). Stejně tak i mortalita roste z 6,88/100 000 obyvatel (rok 2000) na 8,41/100 000 obyvatel v roce 2021 (obrázek 8) (data [www.svod.cz](http://www.svod.cz)).

**Obrázek 8.** Incidence a mortalita hepatocelulárního karcinomu v České republice (obrázek dostupný z [www.svod.cz](http://www.svod.cz)).



Asi 80-90 % případů hepatocelulárního karcinomu se vyvine u pacientů s cirhózou, proto je u nich důležitá aplikace různých terapeutických možností omezena na celkový stav pacienta (Global Burden of Disease Liver Cancer *et al.*, 2017). Léčba se přiřazuje podle stádií nádoru a očekávaných přínosů podle stagingového systému BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) (Llovet *et al.*, 1999). Pacienti s hepatocelulárním nádorem v časném stádiu jsou preferovanými kandidáty pro transplantaci jater, zatímco pacienti s pokročilým onemocněním budou nejprve dostávat systémovou léčbu, a až poté u nich dojde k transplantaci jater (D'Amico *et al.*, 2018).

#### **1.2.4.2. Rizikové faktory**

Mezi rizikové faktory hepatocelulárního karcinomu patří infekce hepatitidou typu B a C (HBV, HCV), chronická konzumace alkoholu, diabetes mellitus II. typu, nealkoholická steatóza jater (NASH), nebo vzácná metabolická onemocnění, jako je hereditární hemochromatóza nebo deficiencie  $\alpha$ 1-antitrypsinu (Marrero *et al.*, 2018). Všechny uvedené faktory způsobují progredující změny jaterního parenchymu, které mohou vyústit do jaterní cirhózy. Až jedna třetina pacientů s jaterní cirhózou následně vyvine hepatocelulární karcinom (Sangiovanni *et al.*, 2006). Hepatocelulární karcinom u pacientů spojený s nealkoholickou steatózou jater se u 25-30 % případů vyskytuje v nepřítomnosti cirhózy (Kanwal *et al.*, 2018). V případě pacientů s hepatitidou typu B může být hepatocelulární karcinom vyvinut i v nepřítomnosti cirhózy, ačkoliv většina pacientů s hepatitidou typu B indukovaným hepatocelulárním karcinomem má přítomnou cirhózu jater (Kew, 2003).

#### **1.2.4.3. Dědičné predispozice k hepatocelulárnímu karcinomu**

V porovnání s ostatními nádory jsou hereditární nádory jater poměrně vzácné (Ozturk, 1999). Nicméně dvě nedávné studie překvapivě popsaly výskyt dědičné predispozice u přibližně 12 % pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Pacienti byli nosiči patogenních zárodečných variant u některých ze známých nádorově predispozičních genů pro vznik dědičného karcinomu prsu a ovaria (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*), nebo v genech Lynchova syndromu (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) (Mezina *et al.*, 2021, Uson Junior *et al.*, 2022). Dále byly nalezeny patogenní varianty v genech *FANCA* a *BRIP1*, které jsou také zapojeny

do homologní rekombinace, a patogenní varianty v těchto genech mohou vést k ovariálnímu karcinomu či karcinomu prostaty (Beltran *et al.*, 2015, Nicolosi *et al.*, 2019).

Budoucí studie by měly zkoumat zejména interakce mezi faktory prostředí a dědičnou predispozicí k hepatocelulárnímu karcinomu. Je velmi pravděpodobné, že jedinci se zárodečnými defekty v genech pro opravu DNA mohou být náchylnější k hepatocelulárnímu karcinomu vzhledem k tomu, že chronický zánět (který se vyskytuje i u cirhózy) může vyvolávat dvouřetězcové zlomy DNA v jaterních buňkách (Mezina *et al.*, 2021).



## 2. Cíle práce

Cílem této disertační práce bylo charakterizovat genetické predispozice spojené s výskytem:

1. Melanomu,
2. karcinomu endometria,
3. karcinomu ovaria,
4. hepatocelulárního karcinomu.

Tedy nádorových onemocnění, u kterých byla doposud genetická komponenta vysoce a středně penetrantních genů v ČR studována nesystematicky či vůbec. Práce si kladla za cíl identifikovat zárodečné patogenní varianty v predispozičních genech k těmto onemocněním u pacientů v ČR a popsat základní fenotypové charakteristiky, které by mohly přispět k lepší identifikaci těchto vysoce rizikových jedinců v České republice.

Práce řešila následující dílčí úkoly:

- Stanovení frekvence a identifikace zárodečných variant ve známých nádorově predispozičních genech a v kandidátních genech pro pacienty s melanomem, karcinomem endometria, ovaria a hepatocelulárním karcinomem.
- Srovnání klinicko-patologických charakteristik u nosičů zárodečných patogenních variant s pacienty, kteří byli bez mutací.
- Určení rizika vzniku daného nádorového onemocnění se zárodečnými patogenními variantami v jednotlivých genech.

Výsledky této disertační práce mohou poskytnout porozumění genetickým predispozicím spojených s dědičnými formami melanomu, karcinomu endometria, ovaria a hepatocelulárního karcinomu, což může přispět k lepší diagnostice či prevenci těchto nádorů v České republice.

### 3. Metody

#### 3.1. Soubor testovaných pacientů a kontrol

Práce zahrnuje čtyři různé skupiny pacientů se studovanými nádorovými onemocněními, melanomem, karcinomem endometria, ovaria, a hepatocelulárním karcinomem.

##### 3.1.1. Soubor pacientů s melanomem

Výzkum zaměřený na pacienty s melanomem byl proveden na skupině 264 pacientů, která zahrnovala 129 pacientů (97 žen a 32 mužů) z Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (VFN) a 135 (96 žen a 39 mužů) pacientů z Masarykova onkologického ústavu v Brně (MOÚ). Protože jsme očekávali celkově nízkou prevalenci patogenních variant, zaměřili jsme se na rizikové pacienty, s časným či mnohočetným výskytem onemocnění u probandů nebo s rekurentním výskytem v jejich rodinách. Charakteristika těchto pacientů je uvedena v **tabulce 1**. Všichni pacienti poskytli informovaný souhlas s účastí na studii schválený Etickými komisemi obou institucí.

**Tabulka 1.** Charakteristika skupiny kombinující osobní nádorovou anamnézu a rodinnou nádorovou anamnézu u 264 pacientů

| Kritéria                               | Pozitivní RA (s mel) | Pozitivní RA (ostatní nádory) | Negativní RA | Neznámá RA   | Pacienti, N (%) | Průměrný věk v letech (rozsah) |
|--|----------------------|-------------------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------------------------|
| Mnohonásobný primární mel a jiný nádor | 0                    | 4                             | 0            | 2            | 6 (2,3)         | 45,0 (38-58)                   |
| Mnohonásobný primární mel              | 5                    | 8                             | 3            | 1            | 17 (6,4)        | 37,3 (24-75)                   |
| Mel a jiný nádor                       | 9                    | 45                            | 9            | 8            | 71 (26,9)       | 47,3 (14-83)                   |
| Pouze mel do 25 let                    | 5                    | 17                            | 11           | 3            | 36 (13,6)       | 20,0 (9-24)                    |
| Pouze mel, nad 25 let                  | 41                   | 62                            | 24           | 7            | 134 (50,8)      | 37,1 (25-69)                   |
| Pacienti, N (%)                        | 60 (22,7)            | 136 (51,5)                    | 47 (17,8)    | 21 (8,0)     | 264 (100)       | 37,7 (9-83)                    |
| Průměrný věk v letech (rozsah)         | 38,9 (9-69)          | 37,8 (14-83)                  | 33,0 (15-66) | 44,2 (14-75) | -               | -                              |

Mel = melanom, RA = rodinná nádorová anamnéza

### 3.1.2. Soubor pacientek s karcinomem endometria

Tato retrospektivní studie byla provedena na 527 pacientkách s děložními malignitami (tabulka 2). DNA byla poskytnuta devíti pracovišti v rámci konsorcia CZECANCA (1. LF UK a VFN Praha, GENNET, MOÚ Brno, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, laboratoře AGEL, Fakultní nemocnice v Plzni, GHC Genetics a Pronatal) a Banky biologického materiálu (1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy). Do studie byly zahrnuty pacientky se zhoubnými nádory dělohy diagnostikovanými v letech 2011-2021. Studie byla schválena Etickou komisí a všechny pacientky poskytly informovaný souhlas s účastí ve studii.

Převažujícím typem nádoru zhoubných novotvarů dělohy u analyzovaných pacientek byl karcinom endometria (89,7 %). Pacientky byly zařazeny do studie na základě indikace ke genetickému testování (vzorky z CZECANCA konsorcia), nebo se jednalo o neselektované pacientky (pacientky z Banky biologického materiálu). Pacientky byly rozděleny do skupin na základě platných indikačních kritérií pro genetické testování na Lynchův syndrom (LS) a hereditární nádorový syndrom prsu a ovaria (HBOC) (Foretova et al., 2019b).

**Tabulka 2.** Klinicko-patologické charakteristiky 527 pacientek se zhoubnými nádory dělohy

|  | Všechny pacientky s EC<br>N=527; (%) | Charakteristika na základě indikačních kritérií |                         |                        |                            |
|--|--------------------------------------|---|-------------------------|------------------------|----------------------------|
|  |                                      | Pouze LS<br>N=151; (%)                          | Pouze HBOC<br>N=16; (%) | LS + HBOC<br>N=82; (%) | Neindikované<br>N=278; (%) |
| <b>Věk v době diagnózy EC</b>              |                                      |   |                         |                        |                            |
| Neznámý věk                                | 10                                   | 3   | 1                       | 2                      | 4                          |
| Průměrný věk v letech                      | 59,1                                 | 50,8  | 59,0                    | 51,3                   | 65,8                       |
| Medián v letech                            | 60,5                                 | 47,8  | 57,0                    | 49,0                   | 65,3                       |
| Rozmezí v letech                           | 24-92                                | 24-91   | 51-73                   | 28-81                  | 50-92                      |
| <50 let                                    | 120 (23,2)                           | 79 (53,4)                                       | 0 (0,0)                 | 41 (51,3)              | 0 (0,0)                    |
| ≥50 let                                    | 397 (76,8)                           | 69 (46,6)                                       | 15 (100,0)              | 39 (48,8)              | 274 (100,0)                |
| <b>Mnohočetné nádory v osobní anamnéze</b> |                                      |   |                         |                        |                            |
| Přítomny                                   | 214 (40,6)                           | 69 (45,7)                                       | 16 (100)                | 82 (100,0)             | 47 (16,9)                  |
| Nepřítomny                                 | 313 (59,4)                           | 82 (54,3)                                       | 0 (0,0)                 | 0 (0,0)                | 231 (83,1)                 |
| <b>Další nádory v osobní anamnéze</b>      |                                      |   |                         |                        |                            |
| CRC  | 31 (5,9)                             | 31 (20,5)                                       | 0 (0,0)                 | 0 (0,0)                | 0 (0,0)                    |
| OC   | 59 (11,2)                            | 0 (0,0)   | 1 (6,3)                 | 58 (70,7)              | 0 (0,0)                    |
| BC   | 80 (15,2)                            | 14 (9,3)  | 15 (93,8)               | 13 (15,9)              | 38 (13,7)                  |
| Tři nádory EC + (BC/OC/CRC)                | 13 (2,5)                             | 2 (1,3)   | 0 (0,0)                 | 11 (13,4)              | 0 (0,0)                    |
| Jiné                                       | 31 (5,9)                             | 22 (14,6)                                       | 0 (0,0)                 | 0 (0,0)                | 9 (3,2)                    |
| <b>Histologie děložních malignit</b>       |                                      |   |                         |                        |                            |
| <b>Karcinom endometria</b>                 | <b>349 (89,7)</b>                    | <b>76 (85,4)</b>                                | <b>8 (72,7)</b>         | <b>48 (100,0)</b>      | <b>217 (90,0)</b>          |

|   |            |            |            |           |            |
|---|------------|------------|------------|-----------|------------|
| Nedostupný  | 4          | 0          | 0          | 0         | 4          |
| Endometrioidní  | 284 (73,0) | 65 (73,0)  | 7 (63,6)   | 44 (91,7) | 168 (69,7) |
| Serózní   | 35 (9,0)   | 4 (4,5)    | 1 (9,1)    | 3 (6,3)   | 27 (11,2)  |
| Světlobuněčný   | 7 (1,8)    | 2 (2,2)    | 0 (0)      | 0 (0)     | 5 (2,1)    |
| Nediferencovaný   | 3 (0,8)    | 2 (2,2)    | 0 (0)      | 0 (0)     | 3 (1,2)    |
| Smišený<br>(endometrioidní/<br>serózní/<br>světlobuněčný) | 1 (0,3)    | 1 (1,1)    | 0 (0)      | 0 (0)     | 0 (0)      |
| Smišený<br>(endometrioidní/<br>světlobuněčný)             | 4 (1,0)    | 0 (0)      | 0 (0)      | 0 (0)     | 1 (0,4)    |
| Endometriální<br>interepiteliální<br>neoplázie            | 8 (2,1)    | 1 (1,1)    | 0 (0)      | 1 (2,1)   | 6 (2,5)    |
| <b>Sarkomy</b>  | 40 (10,3)  | 13 (14,6)  | 3 (27,3)   | 0 (0)     | 24 (10,0)  |
| Nedostupný  | 3          | 2          | 1          | 0         | 0          |
| Leiomyosarkom   | 32 (8,2)   | 9 (10,1)   | 2 (18,2)   | 0 (0)     | 21 (8,7)   |
| Nediferencovaný   | 2 (0,5)    | 0 (0)      | 0 (0)      | 0 (0)     | 2 (0,8)    |
| Endometriální<br>stromální sarkom                         | 3 (0,8)    | 2 (2,2)    | 1 (9,1)    | 0 (0)     | 0 (0)      |
| Bliže neurčený<br>maligní nádor<br>děložního těla         | 138 (26,2) | 62 (41,1)  | 5 (31,3)   | 34 (41,5) | 37 (13,3)  |
| <b>Stádium</b>  |            |            |            |           |            |
| Nedostupné  | 238        | 103        | 10         | 58        | 67         |
| 0   | 8 (2,8)    | 1 (2,1)    | 0 (0)      | 1 (4,2)   | 6 (2,8)    |
| I   | 176 (60,9) | 33 (68,8)  | 4 (66,7)   | 17 (70,8) | 122 (57,8) |
| II  | 38 (13,1)  | 5 (10,4)   | 1 (16,7)   | 2 (8,3)   | 30 (14,2)  |
| III   | 48 (16,6)  | 8 (16,7)   | 1 (16,7)   | 2 (8,3)   | 37 (17,5)  |
| IV  | 19 (6,6)   | 1 (2,1)    | 0 (0)      | 2 (8,3)   | 16 (7,6)   |
| <b>Grade</b>  |            |            |            |           |            |
| Nedostupné  | 184        | 79         | 6          | 47        | 52         |
| 1   | 123 (35,9) | 35 (48,6)  | 4 (40,0)   | 16 (42,7) | 68 (30,1)  |
| 2   | 100 (29,2) | 15 (20,8)  | 3 (30,0)   | 12 (34,3) | 70 (31,0)  |
| 3   | 120 (35,0) | 22 (30,6)  | 3 (30,0)   | 7 (20,0)  | 88 (38,9)  |
| <b>Rodinná nádorová historie</b>                          |            |            |            |           |            |
| Neznámá   | 21         | 4          | 3          | 6         | 8          |
| Pozitivní   | 353 (69,8) | 120 (81,6) | 13 (100,0) | 56 (73,7) | 164 (60,7) |
| Negativní   | 153 (30,2) | 27 (18,4)  | 0 (0)      | 20 (26,3) | 106 (39,3) |
| <b>Nádory v rodinné anamnéze</b>                          |            |            |            |           |            |
| Neznámé   | 21         | 4          | 3          | 6         | 8          |
| EC  | 35 (6,9)   | 14 (9,5)   | 1 (7,7)    | 6 (7,9)   | 14 (5,2)   |
| CRC   | 88 (17,4)  | 39 (26,5)  | 4 (30,8)   | 15 (19,7) | 30 (11,4)  |
| OC  | 15 (3,0)   | 7 (4,8)    | 1 (7,7)    | 5 (6,6)   | 2 (0,7)    |
| BC  | 60 (11,9)  | 14 (9,5)   | 1 (7,7)    | 6 (7,9)   | 14 (5,2)   |
| Mnohočetné<br>(EC/OC/CRC)                                 | 10 (2,0)   | 10 (6,8)   | 0 (0)      | 0 (0)     | 0 (0)      |
| Jiné  | 145 (28,7) | 36 (24,5)  | 4 (30,8)   | 21 (27,6) | 84 (31,1)  |
| Žádné   | 153 (30,2) | 27 (18,4)  | 0 (0)      | 20 (26,3) | 106 (39,3) |

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

Procenta byla vypočítána z celkového počtu pacientů se známými charakteristikami

### **3.1.2.1. Indikační kritéria ke genetickému testování pro hereditární karcinom prsu a ovaria**

Osobní nádorová anamnéza:

- Pacientka s karcinomem prsu je mladší 45 let, nebo mladší 50 let, není-li známá rodinná nádorová anamnéza.
- Pacient je muž s karcinomem prsu.
- Pacientka byla diagnostikována s nádorovou duplicitou karcinomu prsu a pankreatu.
- Pacientka s bilaterálním karcinomem prsu, kdy první nádor vyvinula do 50 let, nebo oba karcinomy do 60 let.
- Pacientka byla diagnostikována s triple negativním karcinomem prsu ve věku pod 60 let.
- Pacientka byla diagnostikována buď s karcinomem ovaria, nebo blíže neurčeným karcinomem pohlavních orgánů nebo s karcinomem peritonea.

Rodinná nádorová anamnéza

- Pacientka a alespoň dva další příbuzní byli diagnostikováni s karcinomem prsu.
- Pacientka a jeden další příbuzný má karcinom prsu, kdy alespoň jeden je do 50 let nebo oba mladší 60 let.
- Pacientka a přímý příbuzný (potomek, sourozenec, rodič) byli diagnostikováni s karcinomem ovarií, vejcovodu či peritoneálním tumorem, triple negativním nebo medulárním karcinomem prsu, karcinomem pankreatu anebo karcinomem prostaty (s GS>7).

### **3.1.2.2. Indikační kritéria pro genetické testování pro Lynchův syndrom (kolorektální karcinom a karcinom endometria)**

- Pacientovi byl diagnostikován tumor ve věku do 50 let.
- U pacienta byla potvrzena mikrosatelitová nestabilita ve věku do 60 let.
- Pacient má kromě karcinomu endometria či kolorektálního karcinomu souběžnou diagnózu spojenou s Lynchovým syndromem (karcinom žaludku, pankreatu, ovaria, tenkého střeva, močového měchýře a ledviny).

- Pacient má kolorektální karcinom a více než 10 polypů/adenomů.
- Pacient a jeden přímý příbuzný mají diagnózu spojenou s Lynchovým syndromem ve věku pod 50 let.
- Pacient a dva příbuzní mají diagnózu spojenou s Lynchovým syndromem v jakémkoliv věku.

### 3.1.3. Soubor patientek s karcinomem ovaria

V rámci studie karcinomu ovaria bylo vyšetřeno 1333 patientek. Klinicko-patologická data (**tabulka 3**) byla získána během genetické konzultace. Patientky s pozitivní rodinnou anamnézou (RA) byly rozděleny do kategorií na patientky s hereditárním karcinomem ovaria v rodinné anamnéze, patientky s hereditárním syndromem karcinomu prsu a ovaria, patientky s hereditárním karcinomem prsu a/nebo ovaria nebo jiným nádorem v rodinné anamnéze a patientky s více nádory v rodinné historii (ale nejedná se o karcinom prsu nebo ovaria). Patientky byly testovány v sedmi centrech: ILF UK a VFN Praha, Masarykův Onkologický Ústav v Brně, GENNET, Laboratoř AGEL Nový Jičín, GHC Genetika, Pronatal a Fakultní nemocnice Olomouc. Z 1333 patientek bylo 1045 (78,4 %) diagnostikováno pouze s karcinomem ovaria, 288 (21,6 %) byly ženy se dvěma primárními nádory, a to nádory prsu (210 patientek; 15,8 %), nebo jinými nádory (78 patientek; 5,9 %). Patientky byly diagnostikovány s nádorem ovaria v letech 2010-2018. Všechny patientky poskytly informovaný souhlas s účastí na studii schválený Etickou komisí VFN v Praze.

**Tabulka 3:** Klinicko-patologická charakteristika 1333 patientek s OC.

| Kategorie                  | N (%)      | Kategorie                        | N (%)      |
|----------------------------|------------|----------------------------------|------------|
| <b>Věk v době diagnózy</b> |            | <b>Rodinná nádorová anamnéza</b> |            |
| Neznámý věk                | 33         | Neznámá                          | 99         |
| <30 let                    | 84 (6,5)   | HOC                              | 119 (9,6)  |
| 30-39 let                  | 152 (11,7) | HBOC                             | 345 (28,0) |
| 40-49 let                  | 282 (21,7) | Mnohonásobný karcinom            | 182 (14,8) |
| 50-59 let                  | 360 (27,8) | Negativní                        | 588 (47,7) |
| 60-69 let                  | 328 (25,2) |                                  |            |
| >70 let                    | 94 (7,2)   |                                  |            |
| <b>Histologie</b>          |            | <b>Stádium</b>                   |            |
| Neznámý                    | 213        | Neznámé                          | 373        |
| HG serózní                 | 478 (42,7) | I                                | 302 (31,5) |
| LG serózní                 | 85 (7,6)   | II                               | 86 (9,0)   |
| Serózní nespecifický       | 165 (14,7) | III                              | 472 (49,2) |
| Endometroidní              | 90 (8,0)   | IV                               | 100 (10,4) |
| Mucinózní                  | 43 (3,8)   | <b>Osobní anamnéza</b>           |            |

|               |            |                 |             |
|---------------|------------|-----------------|-------------|
| Světlobuněčný | 15 (1,3)   | Pouze OC        | 1045 (78,4) |
| Border-line   | 154 (13,8) | OC a BC         | 210 (15,8)  |
| ostatní       | 90 (8,0)   | OC a jiný nádor | 78 (5,9)    |

BC – karcinom prsu, HBOC – hereditární karcinom prsu a ovaria, HOC – hereditární karcinom ovaria, OC – ovariální karcinom

### 3.1.4. Soubor pacientů s hepatocelulárním karcinomem

Soubor pacientů s hepatocelulárním karcinomem tvořilo 334 pacientů (258 mužů a 76 žen; viz **tabulka 4**), kteří byli od srpna roku 2002 do září 2021 v rámci Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze zařazeni jako kandidáti pro transplantaci jater. U 329/334 (98,5 %) pacientů byla cirhóza diagnostikována v souladu s doporučeními před nástupem hepatocelulárního karcinomu. U pěti pacientů (1,5 %) nebyl nalezen průkaz jaterní cirhózy.

Celkem 299 pacientů podstoupilo transplantaci jater, dalších 34 pacientů bylo léčeno pomocí paliativní onkologické léčby a jeden pacient podstoupil resekci jater. Medián doby sledování pacientů byl 4,2 let (rozmezí od 0,1-22,2 let). Kromě dvou pacientů byli všichni českého původu. Všichni pacienti poskytli písemný souhlas se zařazením do studie.

**Tabulka 4.** Klinicko-patologická charakteristika všech 334 pacientů s hepatocelulárním karcinomem.

| Kategorie                      | Všichni pacienti<br>N=334; (%) | Muži N=258; (%)   | Ženy N=76; (%)   |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|------------------|
| Medián věku (rozmezí) v letech | 63 (26-77)                     | 63 (36-75)        | 65 (26-77)       |
| <b>Cirhóza</b>                 | <b>329 (98,5)</b>              | <b>254 (98,4)</b> | <b>75 (98,7)</b> |
| Nebyla přítomna                | 5 (1,5)                        | 4 (1,6)           | 1 (1,3)          |
| Alkoholická                    | 129 (38,6)                     | 115 (44,6)        | 14 (18,4)        |
| Virová                         | 120 (35,9)                     | 77 (29,8)         | 43 (56,6)        |
| Cholestatická a autoimunitní   | 48 (14,4)                      | 37 (14,3)         | 11 (14,5)        |
| Nealkoholická steatóza         | 29 (8,7)                       | 23 (8,9)          | 6 (7,9)          |
| Metabolická                    | 3 (0,9)                        | 2 (0,8)           | 1 (1,3)          |
| <b>Léčba HCC</b>               |                                |                   |                  |
| Transplantace jater            | 299 (89,5)                     | 225 (87,2)        | 74 (97,4)        |
| Ostatní                        | 35 (10,5)                      | 33 (12,8)         | 2 (2,6)          |
| <b>Charakteristiky HCC</b>     |                                |                   |                  |
| AFP – medián (rozsah) (µg/ml)  | 8,3 (0,9-5784)                 | 7,4 (0,9-5784)    | 15,0 (1,9-1210)  |
| Milánská kritéria              | 220 (65,9)                     | 168 (65,1)        | 52 (68,4)        |
| Angioinvaze                    | 128 (45,6)                     | 91 (43,8)         | 37 (50,7)        |
| Grade 1                        | 37 (13,0)                      | 22 (10,3)         | 15 (21,1)        |
| Grade 2                        | 154 (54,0)                     | 123 (57,5)        | 31 (43,7)        |
| Grade 3                        | 94 (33,0)                      | 69 (32,2)         | 25 (35,2)        |
| Mnohočetný primární tumor      | 57 (17,1)                      | 48 (18,7)         | 9 (11,9)         |
| Pozitivní nádorová historie    | 131 (39,2)                     | 99 (38,4)         | 32 (42,1)        |
| Diabetes                       | 138 (41,3)                     | 117 (45,3)        | 21 (27,6)        |
| Obezita (BMI>30)               | 94 (28,1)                      | 161 (62,4)        | 31 (40,8)        |
| Kouření                        | 192 (57,5)                     | 161 (62,4)        | 31 (40,8)        |

### **3.1.5. Soubor kontrol**

V rámci analýz byly použity kontrolní skupiny, které se postupně rozšiřovaly získáváním dalších kontrolních vzorků. Ve studii s maligním melanomem byla použita kontrolní skupina 1479 neselektovaných jedinců (1014 mužů, průměrný věk 55,5 let, ve věku od 18-88 let a 465 žen, průměrný věk 56,8 let ve věku od 18-84) poskytnutá z projektu celoexomového sekvenování v Národním centru pro lékařskou genomiku (NCMG; <https://ncmg.cz>). Kontroly z NCMG byly použity i ve studii karcinomu ovaria, endometria a hepatocelulárního karcinomu. Pro endometriální, ovariální a hepatocelulární karcinom bylo použito 1662 neselektovaných kontrol (1170 mužů a 492 žen, s mediánem věku 57 let) z Národního centra pro lékařskou genomiku.

Jako druhá skupina kontrol bylo při studiu karcinomu endometria použito 777 jedinců (89 mužů a 688 žen) starších 60 let bez pozitivní nádorové osobní a rodinné anamnézy. Pro studium hepatocelulárního karcinomu byla jako druhá skupina použito 791 zdravých kontrol nenádorových jedinců starších 60 let (92 mužů a 697 žen) bez osobní či rodinné nádorové anamnézy. V rámci studia karcinomu ovaria bylo dále vyšetřeno 616 nenádorových kontrol (78 mužů a 538 žen) nad 60 let bez osobní a rodinné nádorové anamnézy, tyto kontroly byly shromážděny v rámci konsorcia CZEKANCA.

### **3.2. Izolace DNA z periferní krve**

Z leukocytů z periferní krve byla izolována DNA pomocí Wizard Genomic DNA Purification Kitu (Promega) dle instrukcí od výrobce.

### **3.3. Sekvenování nové generace**

Genomová DNA byla analyzována pomocí panelového NGS, jak bylo popsáno dříve (Soukupova et al., 2018). Výsledky z této analýzy byly dále zpracovány pomocí bioinformatických kroků (uvedených v kapitole 3.5.).



### 3.3.1. Sekvenační panel CZECANCA

Analýza genomové DNA od pacientů s karcinomem endometria, ovaríí a hepatocelulárním karcinomem byla provedena pomocí panelu CZECANCA ([www.czecanca.cz](http://www.czecanca.cz)). Tento panel cílí na 226 kandidátních nádorových predispozičních genů (Soukupova et al., 2018)

### 3.3.2. Sekvenační panel CZMELAC

Sekvenační panel CZMELAC (CZech MELAnoma panel for Cancer predisposition genes) byl použit pro analýzu vzorků genomové DNA pacientů s melanomem. Tento panel (NimbleDesign; Roche) cílil na 217 genů včetně genů s vysokým, středním a nízkým rizikem pro vznik melanomu, predispozičních genů pro další nádorová onemocnění a genů asociovaných s melanomem v databázi Phenopedia (<https://phgkb.cdc.gov/PHGKB/startPagePhenoPedia.action>) (Stolarova et al., 2020a).

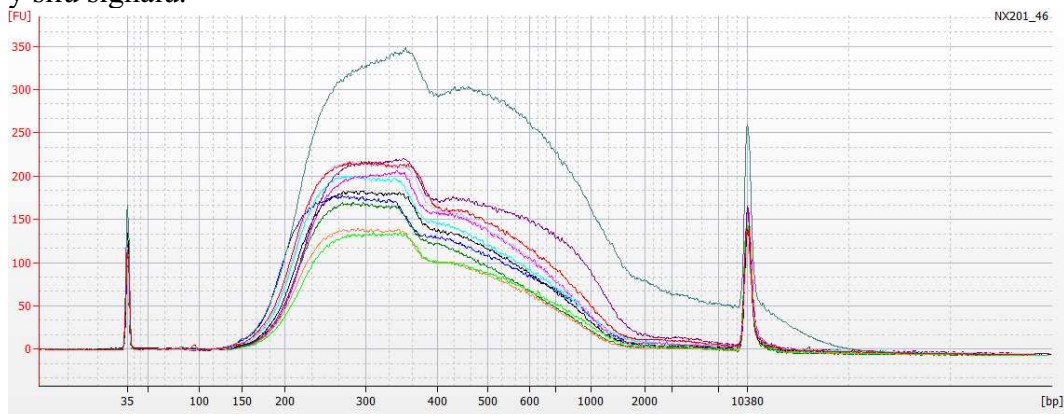
### 3.3.3. Příprava NGS knihovny

Příprava NGS knihovny zahrnovala fragmentaci DNA, enzymatickou úpravu fragmentů, ligaci adaptorů, inkorporaci specifických indexů pomocí PCR, nabohacení cílové sekvence panelu a amplifikaci produktu pomocí PCR.

Pro NGS jsme použili 200-500 ng genomové DNA, která byla dále zpracována pomocí enzymatického štěpení DNA fragmentázou pomocí kitu KAPA HyperPlus (Roche), nebo pomocí sonikace (Covaris E220; Covaris) s využitím kitů KAPA HTP Library Preparation dle instrukcí výrobce (KAPA, Biosystems, Roche). Po ligaci univerzálních adaptorů byly konce fragmentů označeny pomocí unikátních indexů. Unikátní indexy nám umožňují analyzovat směsné vzorky jednotlivých pacientů. Vzorky se následně inkubovaly s hybridizačními sondami sekvenačního panelu CZECANCA nebo CZMELAC, kde po inkubaci byla knihovna vzorků znovu amplifikována pomocí poslední PCR pro dosažení optimální výsledné koncentrace.

Velikost a kvalita fragmentů byla kontrolována pomocí kapilární elektroforézy (Agilent 2100, Agilent, **obrázek 9**) a výsledná knihovna vzorků byla sekvenována na přístroji MiSeq případně NextSeq pomocí příslušné sekvenační chemie (Illumina).

**Obrázek 9.** Kontrola rozložení velikosti fragmentů DNA knihovny po pre-capture PCR na přístroji Bioanalyzer 2100. Na ose x můžeme odečíst velikost fragmentů (bp) a na ose y sílu signálu.



### 3.4. Analýza sestřihových variant

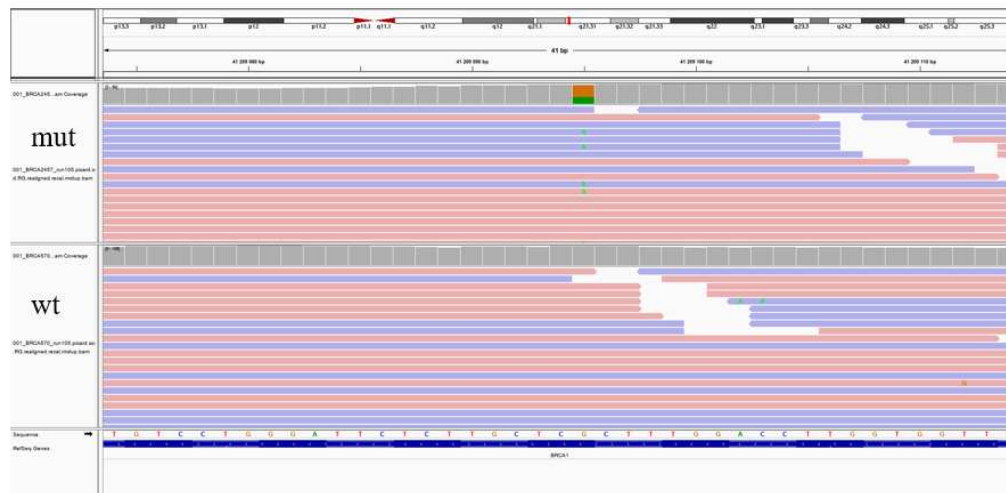
Všechny RNA izolované od pacientů s melanomem byly izolovány z leukocytů periferní krve. Sestřihové varianty byly analyzovány pomocí metody RNA NGS s použitím panelu CZMELAC a následně byly podrobeny bioinformatickému zpracování, tak jak bylo popsáno v předchozí studii (Walker et al., 2019).

### 3.5. Bioinformatické zpracování

Sekvenační data získaná ze sekvenátoru byla zpracována bioinformatickou skupinou vedenou Mgr. Petrou Zemánkovou, Ph.D. v naší laboratoři. Výsledkem sekvenace, jsou textová data ve formátu FASTQ. Kvalita čtení bází byla kontrolována pomocí softwaru FastQC v0.11.2. Sekvenační data byla dále mapována na referenční genom hg19 pomocí programu Novoalign v2.08.03, tím byly vytvořeny soubory ve formátu SAM, které pomocí Picard tools v1.129 byly přeměněny na formu BAM. Kontrola kvality namapovaných bází na referenční genom byla provedena pomocí programu Genome Analysis Toolkit (GATK) v3.8.1 (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>). BAM soubory byly nadále pomocí GATK pipeline převedeny na VCF (variant-call format) formát a poté byly anotovány pomocí nástroje SnpEff 4.3. Pro vizualizaci sekvenačních dat z BAM formátu byl použit program IGV (Integrative Genomics Viewer, **obrázek 10A**). Velké genomové přestavby (CNV, copy number variation, **obrázek 10B**) byly analyzovány nástrojem CNVkit 0.7.4

(<https://pypi.python.org/pypi/CNVkit>), zatímco středně dlouhé inserce/delece byly hodnoceny pomocí softwaru Pindel 0.2.5a7 (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>) (Soukupova et al., 2018).

**Obrázek 10. A.** Analýza patogenní varianty (*BRCA1*:c.5251C>T/p.Arg1751Ter) v programu IGV. Mut značí pacienta s patogenní variantou a wt značí pacienta bez patogenní varianty.



### 3.6. Statistické zpracování

Porovnání frekvence zárodečných patogenních variant pacientů a kontrol bylo provedeno pomocí Fisherova testu či pomocí  $\chi^2$  testu.

### 3.7. Analýza dat

#### 3.7.1. Skupiny genů pro melanom

V rámci studie dědičné predispozice pro melanom bylo 217 genů panelu CZMELAC rozděleno do čtyř skupin. Na geny vysoce a středně penetrantní pro melanom (8 genů – *ACD*, *BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *MITF*, *POT1*, *TERF2IP*, *TERT*), geny s nízkým rizikem melanomu (26 genů – *AGR3*, *ARNT*, *ASIP*, *CASP8*, *CCND1*, *CDKN2B*, *CLPTMIL*, *FTO*, *HERC2*, *IRF4*, *MC1R*, *MGMT*, *MTAP*, *MX2*, *OBFC1*, *OCA2*, *PARP1*, *PAL2G6*, *SETDB1*, *SLC24A4*, *SLC45A2*, *TERF1*, *TERF2*, *TINF2*, *TYR*, *TYRP1*), geny kandidátní pro jiná nádorová onemocnění (37 genů – *APC*, *ATM*, *BARD1*, *BMPR1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDHI*, *FH*,

*CHEK2, KIT, MET, MSH2, MSH3, MSH6, NBN, NF1, NF2, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, RET, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, STK11, TP53, VHL, WRN, WT1*) a geny s neznámým vlivem na vývoj dědičného melanomu (zbylých 146 genů – *ABLIM1, APEX1, ATRN, AURKA, BBC3, BLM, BRAF, BRMS1, CASP10, CBL, CCAR2, CCNH, CDK10, CDK7, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CEBPA, COX8A, CTLA4, CTNNA1, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1, CYP11A1, CYP11A2, CPY3A5, DAB2IP, DCAF4, DDB1, DDB2, EDNRB, EGF, EGFR, EIF1AX, EPCAM, EBB2, ERBB4, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, EXOC2, EZH2, FANCC, FANCL, FANCM, FAS, FASLG, FGF2, FGF4, FLCN, FLT1, FOXP3, GATA2, GATA4, GC, GNA11, GNAQ, GPC3, GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1, H2AFY, HRAS, IDH1, IDH2, IFIH1, IFNA1, IFNG, IL10, IL2RA, IL4, IL6, IL8, ING4, KAT6A, KIAA1967, KMT2A, KRAS, LRIG1, MPA2K1, MDM2, MLH1, MLH3, MMP1, MMP3, MUTYH, MYH7B, NCOA6, NFKB1, NFKBIE, NOD2, NOTCH3, NRAS, PAX5, PDGFRA, PIGU, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R4, PMA1P1, PMS1, POLH, POMC, PPM1D, PPP6C, PRF1, PTGS2, PTCH1, PTPN11, PTPN22, RAC1, RAD23A, RAD23B, RASEF, RECQL, RECQL4, RHOTB2, RUNX1, SBDS, SF3B1, SH2B3, SLX4, SMARCB1, SNX31, STAG2, STK19, SUZ12, TAC1, TERC, TLR3, TRPM1, TSC1, TSC2, VDR, XAB2, XPA, XPC, XRCC1, XRCC3, ZNF365*).

### **3.7.2. Skupiny genů pro karcinom endometria**

Při studii dědičné predispozice karcinomu endometria bylo 226 genů z panelu CZECANCA rozděleno do dvou skupin. První skupina byla 19 genů (*ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, EPCAM, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11* a *TP53*), které jsou asociovány s endometriálním karcinomem a 207 ostatních kandidátních genů.

### **3.7.3. Skupiny genů pro karcinom ovaria**

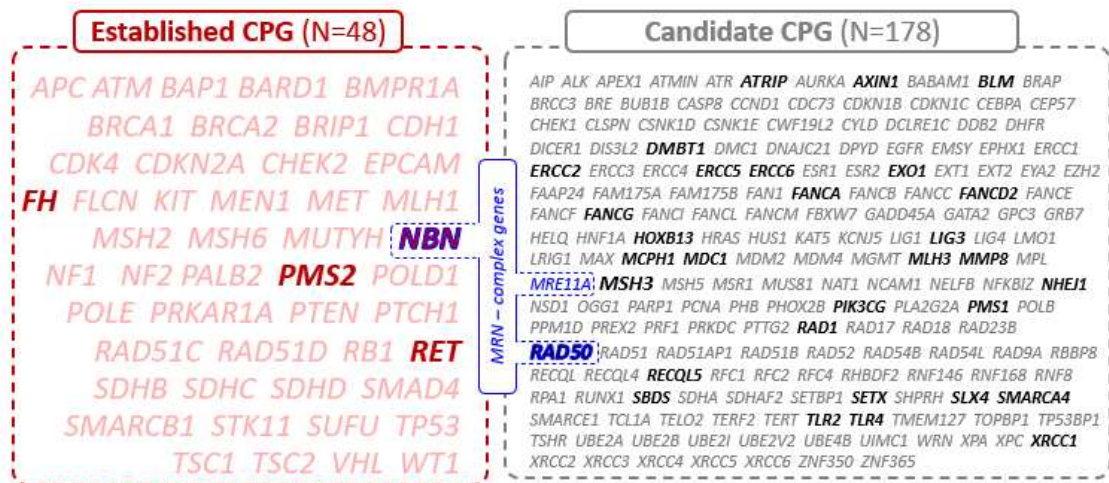
V rámci studie dědičné predispozice karcinomu ovaria bylo z 219 genů (starší verze) panelu CZECANCA vybráno 18 predispozičních genů pro karcinom prsu a ovaria (dle NCCN guidelines, verze 1.2020, dostupné 4. prosince 2019) - *ATM, BARD1, BRCA1,*

*BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD51D, RAD51C, STK11 a TP53.*

### 3.7.4. Skupiny genů pro hepatocelulární karcinom

Pro studii dědičné predispozice hepatocelulárního karcinomu bylo použito 226 genů z panelu CZEKANCA, které byly rozděleny do dvou skupin na potvrzené nádorové predispoziční geny (48 genů) a kandidátní nádorové predispoziční geny (178 genů – viz **obrázek 11**).

**Obrázek 11.** Seznam 226 nádorově predispozičních genů rozdělených do dvou skupin na potvrzené (červené) a kandidátní (šedé) nádorové predispoziční geny. Geny MRN komplexu jsou označeny modře.



### 3.7.5. Prioritizace variant

Cílem prioritizace variant bylo identifikovat potenciální patogenní/pravděpodobně patogenní varianty. Prioritizace zahrnovala postupnou filtraci variant s odstraněním variant:

- s nízkou sekvenační kvalitou ( $q < 150$ ).
- variant uložených hluboko v intronu či UTR varianty.
- intronových variant mimo kanonická sestřihová místa ( $\pm 1-2$  nukleotidy v přilehlém intronu).
- variant s alelickou frekvencí (minor allele frequency, MAF)  $> 0,003$  v populačních databázích (Exome Sequencing Project, gnomAD, 1000 Genomes Project).
- Variant s frekvencí  $N > 2$  (tedy  $\sim 0,3\%$ ) u populačních kontrol.
- synonymních variant.

- variant s klasifikací v ClinVar databázi jako benigní či pravděpodobně benigní.
- variant s opakujícími se úseky v sekvenci (repeat masker track – rnsk).
- nonsense a posunové varianty uložené v posledním exonu.

Filtrační kroky nebyly aplikovány, pokud daná varianta byla v ClinVar databázi uvedena jako patogenní či pravděpodobně patogenní. Patogenní/pravděpodobně patogenní varianty v databázi ClinVar s pouze jedním přispěvatelem nebo rozporuplnou interpretací byly do výsledků zařazeny jako varianty nejasného významu (VUS). Duplikace celých genů a truncační varianty v posledním exonu byly také považovány za VUS (pokud nebyly v ClinVar vedeny jako patogenní/pravděpodobně patogenní (pathogenic/likely pathogenic – P/LP)).

### **3.8. Potvrzení přítomností genetických variant**

Přítomnost patogenní genetické varianty, která byla detekována pomocí NGS analýzy, byla potvrzena Sangerovým sekvenováním s využitím interně navržených primerů nebo pomocí MLPA (Multiplex ligation dependent probe amplification) s využitím příslušných kitů od MRC Holland.

## 4. Výsledky

### 4.1. Identifikace zárodečných variant u pacientů s melanomem



biomedicines



Article

#### Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes

Lenka Stolarova <sup>1,†</sup>, Sandra Jelinkova <sup>1,†</sup>, Radka Storchova <sup>2</sup>, Eva Machackova <sup>3</sup>, Petra Zemankova <sup>1</sup>, Michal Vocka <sup>4</sup>, Ondrej Kodet <sup>5,6,7</sup>, Jan Kral <sup>1</sup>, Marta Cerna <sup>1</sup>, Zuzana Volkova <sup>1</sup>, Marketa Janatova <sup>1</sup>, Jana Soukupova <sup>1</sup>, Viktor Stranecky <sup>8</sup>, Pavel Dundr <sup>9</sup>, Lenka Foretova <sup>3</sup>, Libor Macurek <sup>2</sup>, Petra Kleiblova <sup>10</sup> and Zdenek Kleibl <sup>1,\*</sup>

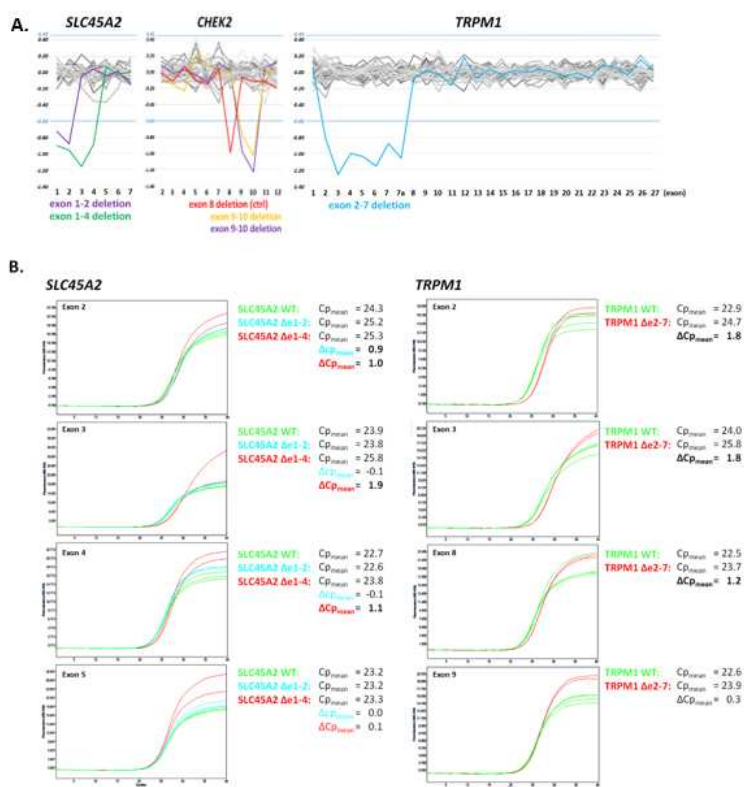
- <sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University, 128 53 Prague, Czech Republic; lenka.stolarova@lf1.cuni.cz (L.S.); sandra.jelinkova@lf1.cuni.cz (S.J.); petra.zemankova@lf1.cuni.cz (P.Z.); jan.kral@lf1.cuni.cz (J.K.); marta.cerna@lf1.cuni.cz (M.C.); zuzana.klusonova@lf1.cuni.cz (Z.V.); marketa.janatova@lf1.cuni.cz (M.J.); jana.soukupova@lf1.cuni.cz (J.S.)
- <sup>2</sup> Laboratory of Cancer Cell Biology, Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague, Czech Republic; radka.storchova@img.cas.cz (R.S.); libor.macurek@img.cas.cz (L.M.)
- <sup>3</sup> Department of Cancer Epidemiology and Genetics, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic; emachack@mou.cz (E.M.); foretova@mou.cz (L.F.)
- <sup>4</sup> Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; michal.vocka@vfn.cz
- <sup>5</sup> Department of Dermatology and Venereology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; ondrej.kodet@vfn.cz
- <sup>6</sup> Institute of Anatomy, First Faculty of Medicine, Charles University, 128 00 Prague, Czech Republic
- <sup>7</sup> BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, 252 50 Vestec, Czech Republic
- <sup>8</sup> Research Unit for Rare Diseases, Department of Paediatrics and Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 121 00 Prague, Czech Republic; Viktor.Stranecky@lf1.cuni.cz
- <sup>9</sup> Department of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic; pavel.dundr@vfn.cz
- <sup>10</sup> Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic; petra.kleiblova@lf1.cuni.cz

\* Correspondence: zdenek.kleibl@lf1.cuni.cz; Tel.: +420-22496-5745

† These authors equally contributed to this work.

Pomocí NGS panelu CZMELAC bylo u 264 pacientů s melanomem nalezeno 16 539 unikátních zárodečných variant. Po aplikaci prioritizačních kritérií byly odstraněny varianty nejasného významu (VUS), které představovaly absolutní většinu (87 %). Finální výběr činil 83 patogenních/pravděpodobně patogenních (P/LP) dědičných variant (66 unikátních) u 71/264 (26,8 %) pacientů s melanomem v 42/217 genech. Do těchto variant bylo zahrnuto i pět CNV (copy number variation) v genech *CHEK2*, *SLC45A2* a *TRPM1* (obrázek 12). U kontrolní skupiny, bylo nalezeno 225 P/LP variant u 204/1479 (13,8 %) kontrol v 82/217 genech. I zde byly nalezeny dvě CNV varianty (obě v genu *CHEK2*).

**Obrázek 12 A.** CNV varianty nalezené u pacientů či kontrol u genů *CHEK2*, *SLC45A2* a *TRPM1*. Pokles normalizované křivky pod hodnotu 0,6 značí delecii. **B.** Konfirmace delecie *SLC45A2* a *TRPM1* pomocí qPCR. Tučně značené rozdíly v hodnotách prahové hodnoty (Cp) indikují delecii analyzovaného exonu.



Celkově bylo nalezeno 43/264 (16,3 %) pacientů (tabulka 5) a 87/1479 (5,9 %) kontrol s patogenními variantami v predispozičních a kandidátních genech pro vznik melanomu.

**Tabulka 5.** Zárodečné P/LP varianty u pacientů s melanomem

|   | Gen: kódující sekvence (proteinová sekvence)          | Lokalizace melanomu (věk) | Ostatní nádory probanda (věk) | Rodinná nádorová anamnéza (kolikrát)          |
|---|---|---------------------------|-------------------------------|---|
| <b>Geny s vysokým až středním rizikem vzniku melanomu</b> |   |                           |                               |   |
| Ž   | <i>CDKN2A</i> :c.16_20del5(p.Gly6GlnfsTer7)           | Trup (38)                 | -                             | BC (1×), Leu (1×), Mel (1×), 3× neznámý nádor |
| Ž   | <i>CDKN2A</i> :c.71G>C(p.Arg24Pro)                    | Trup (24)                 | Mel (35)                      | CRC (1×), Mel (1×), UC (1×)                   |
| Ž   | <i>CDKN2A</i> :c.71G>C (p.Arg24Pro)                   | Trup (28)                 | Mel (38)                      | Mel (2×)                                      |
| Ž   | <i>CDKN2A</i> :c.95_112del(p.Leu32_Leu37del)          | DK (28)                   | GC (48)                       | BC (2×), CRC (1×), GC (1×), LC (1×), Mel (2×) |
| M   | <i>CDKN2A</i> :c.334C>G(p.Arg112Gly)                  | Hlava (43)                | -                             | Mel (1×), PC (1×)                             |
| Ž   | <i>CDKN2A</i> :c.457+4_457+5delAG(p.Tyr129HisfsTer11) | Trup (29)                 | Mel (34)                      | BT (1×)                                       |



|  |  |            |                          |  |
|--|--|------------|--------------------------|--|
| Ž  | <i>POT1</i> :c.347C>T (p.Pro116Leu)<br><i>CHEK2</i> :Δe9-10  | n.a. (41)  | Mel (41, 44);<br>BC (47) | RC (1×)  |
| Ž  | <i>POT1</i> :c.703-1G>C (p.Val235GlyfsTer22)   | n.a. (37)  | TC (34);<br>BT (47)      | BC (1×), CRC (1×),<br>LC (1×), SGC (1×),<br>TC (1×)                |
| M  | <i>ACD</i> :c.755del(p.Asp255AlafsTer9)  | HK (39)    | -                        | Negativní  |
| <b>Geny s nízkým rizikem vzniku melanomu</b>   |  |            |                          |  |
| Ž  | <i>OCA2</i> :c.1211C>T (p.Tyr404Met)<br><i>KAT6A</i> :c.1138G>T (p.Glu380Ter)                                      | n.a.       | -                        | Mel (1×)   |
| M  | <i>OCA2</i> :c.1327G>A(p.Val443Ile)  | Trup (15)  | -                        | Negativní  |
| Ž  | <i>OCA2</i> :c.1327G>A(p.Val443Ile)  | Trup (43)  | -                        | BC (3×), CRC (3×),<br>PC (1×)                                      |
| Ž  | <i>OCA2</i> :c.1327G>A(p.Val443Ile)  | DK (52)    | Lymfom (38);<br>Mel (49) | Leu (1×), neznámý<br>nádor (1×)                                    |
| M  | <i>OCA2</i> :c.2037G>C(p.Trp679Cys)  | n.a. (50)  | -                        | Negativní  |
| M  | <i>OCA2</i> :c.2037G>C(p.Trp679Cys)  | n.a. (68)  | Mel (68)                 | n.a.   |
| M  | <i>TYRP1</i> :c.1054_1057del4(p.Asn353ValfsTer31)<br><i>TRPM1</i> :Δe2-7   | Trup (36)  | -                        | Mel (2×)   |
| M  | <i>SLC45A2</i> : Δe1-2<br><i>GSTM3</i> :c.393C>A(p.Tyr131Ter)  | Okno (25)  | -                        | n.a.   |
| Ž  | <i>SLC45A2</i> : Δe1-4   | Trup (42)  | BC (41)                  | PrC (1×)   |
| M  | <i>TYR</i> :c.650G>A(p.Arg217Gln)  | Trup (37)  | -                        | Negativní  |
| Ž  | <i>TYR</i> :c.1037-7T>A<br><i>FANCC</i> :c.455dupA(p.Asn152LysfsTer9)  | Hlava (66) | BC (52)<br>CRC (66)      | BC (2×), HCC (1×)  |
| Ž  | <i>TINF2</i> :c.796C>T(p.Arg266Ter)  | HK (48)    | -                        | CRC (1×), GbC (1×),<br>Mel (1×), PrC (1×),<br>RC (1×), Sarkom (1×) |
| <b>Geny s nejasným rizikem pro vznik melanomu a geny asociované s hereditárním nádorovým onemocněním</b> |  |            |                          |  |
| Ž  | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | Trup (24)  | -                        | BC (1×), BT (1×),<br>Mel (1×)                                      |
| Ž  | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | Okno (25)  | -                        | Negativní  |
| M  | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | Trup (37)  | -                        | n.a.   |
| Ž  | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | Hlava (45) | Mel (68)<br>OC (56)      | n.a.   |
| Ž  | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | Trup (65)  | OC (67)                  | Negativní  |
| M  | <i>NBN</i> :c.1126delG(p.Asp376IlefsTer2)  | n.a. (47)  | -                        | LC (2×), Mel (1×)  |
| Ž  | <i>NBN</i> :c.1723G>T(p.Glu575Ter)<br><i>NFKBIE</i> :c.165_169dup(p.Glu57AlafsTer51)                               | DK (9)     | BC (50; 59)              | Mel (1×)   |
| M  | <i>BRC A2</i> :c.475G>A(p.Val159Met)   | HK (45)    | RC (46)                  | HL (1×)  |
| Ž  | <i>BRC A2</i> :c.1389_1390del2(p.Val464GlyfsTer3)  | DK (47)    | BC (59; 59)              | GC (2×)  |
| Ž  | <i>BRC A2</i> :5682C> G(p.Tyr1894Ter)  | n.a. (67)  | BT (59)<br>BC (56)       | BC (1×), PrC (2×),<br>retinoblastom (1×)                           |
| M  | <i>BRC A2</i> :c.7007G>A(p.Arg2336His)<br><i>IFIH1</i> :c.2464C>T(p.Arg822Ter)                                     | Hlava (22) | -                        | BT (1×); PrC (2×),<br>TC (1×)                                      |
| M  | <i>BRC A2</i> :c.8168_8172ins4(p.Tyr2726MetfsTer10)<br><i>TYRP1</i> :c.1254C>A(p.Tyr41Ter)                         | n.a. (40)  | Mel (36)<br>Non-HL (38)  | LC (2×)  |
| Ž  | <i>BRC A1</i> :c.68_69del2(p.Glu23ValfsTer17)  | Trup (47)  | OC (57)<br>UC (56; 57)   | n.a.   |
| Ž  | <i>BRC A1</i> :c.1687C>T(p.Gln563Ter)  | Okno (54)  | BC (46)                  | OC (1×)  |
| Ž  | <i>BRC A1</i> :c.4214delT (p.Ile1405LysfsTer10)<br><i>ATM</i> :c.7630-2A>C<br><i>MUTYH</i> :c.1187G>A(p.Gly396Asp) | DK (46)    | OC (46)<br>BC (49)       | BC (3×), OC (2×)   |
| Ž  | <i>BRC A1</i> :c.52666dup(p.Glu1756ProfsTer74)   | Trup (53)  | BC (54)                  | Negativní  |
| M  | <i>CHEK2</i> :Δe9-10   | HK (28)    | -                        | CRC (1×), Lymfom<br>(1×), Mel (1×),<br>MMT (1×)                    |
| M  | <i>CHEK2</i> :c.846+4_846+7del4  | Trup (38)  | -                        | BC (1×), CRC (1×)  |
| Ž  | <i>ATM</i> :c.381del(p.Val128Ter)<br><i>WRN</i> :c.1105C>T(p.Arg369Ter)  | Trup (41)  | Mel (50)                 | BC (1×), PC (1×)   |
| Ž  | <i>ATM</i> :c.5932G>T(p.Glu1978Ter)  | Trup (35)  | -                        | LC (1×), UC (1×)   |

|   |  |           |         |                   |
|---|--|-----------|---------|-------------------|
| Ž | <i>RAD51D</i> :c.405+2T>C<br><i>CHEK2</i> :c.917G>C(p.Gly306Ala) | Trup (26) | -       | CC (1×)           |
| Ž | <i>RBI</i> :c.608-1G>T   | Trup (32) | BC (45) | GbC (1×), LC (1×) |

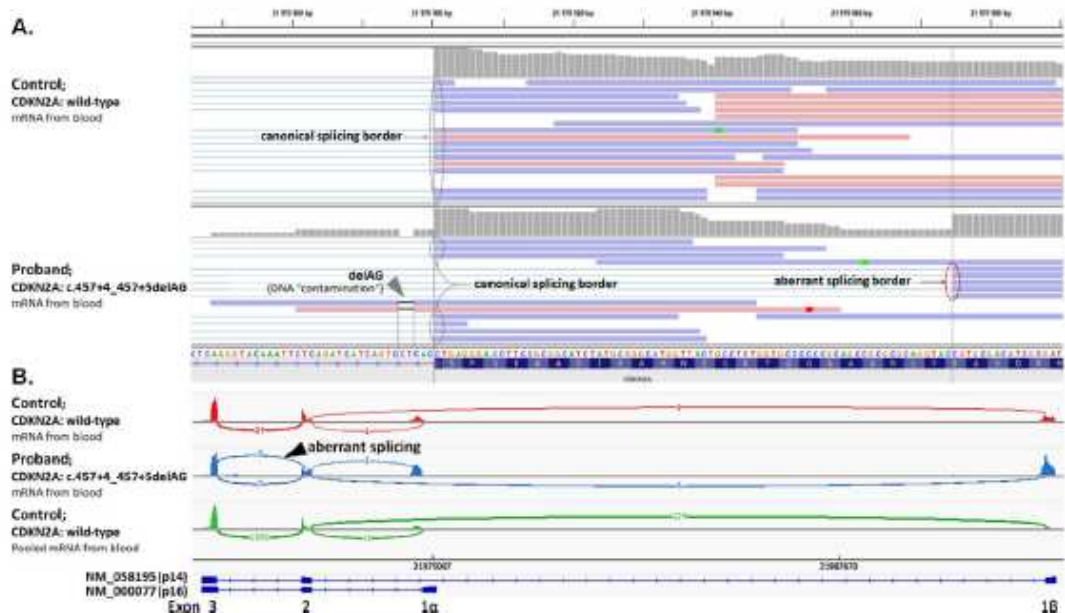
M - muž; Ž - žena; DK - dolní končetina, HK - horní končetina; BC (breast cancer) – karcinom prsu, BT (brain tumor) – nádor mozku, CC (cervix cancer) – nádor dělohy, CRC (colorectal cancer) – kolorektální karcinom, GbC (Gallbladder cancer) – karcinom žlučníku a žlučového, GC (gastric cancer) – karcinom žaludku, HCC (hepatocellular cancer) – nádor jater, HL (Hodgkin lymphoma) – Hodgkinův lymfom, LC (lung cancer) – karcinom plic, Leu (leukemia) – leukemie, Mel (melanoma) – melanom, MMT (malignant mesenchymal tumor) – maligní mesenchymální tumor, OC (ovarian cancer) – karcinom ovaria, PC (pancreatic cancer) – karcinom pankreatu, PrC (prostate cancer) – karcinom prostaty, RC (renal cancer) – karcinom ledviny, SC (skin cancer) – karcinom kůže, SGC (salivary gland cancer) – karcinom slinných žláz, TC (thyroid cancer) – karcinom štítné žlázy; UC (urinary cancer) – karcinom močového měchýře

#### 4.1.1. Mutace ve vysoce až středně rizikových genech pro melanom

Mutace ve vysoce a středně penetrantních genech pro melanom byly zachyceny u 9/264 (3,4 %) pacientů. Nejvyšší četnost patogenních variant byla nalezena u genu *CDKN2A* (tabulka 5), kde jsme u šesti pacientů zachytili varianty označené v ClinVar jako patogenní či pravděpodobně patogenní. Jednalo se o missense varianty c.71G>C (p.Arg24Pro, u dvou pacientů) a c.334C>G (p.Arg112Gly), posunovou variantu c.16\_20delGGGAG (p.Gly6GlnfsTer7), in-frame variantu c.95\_112del18 (p.Leu32Leu37del, způsobující zkrácení C-konce domény ankyrin 1, která sousedí s β-vlášenkou) a nově popsanou sestřihovou variantu c.457+4\_457+5delAG, u které jsme zaznamenali aktivaci aberantního sestřihového místa (r.384\_457del74) se vznikem aberantního sestřihu vedoucího ke vzniku posunové varianty v proteinovém produktu p.Tyr129HisfsTer11 (viz obrázek 13).

Dvě varianty byly nalezeny v genu *POT1* (NM\_015450). Varianta c.703-1G>C byla nalezena u probanda s melanomem, dysplastickými névy a s nádorem štítné žlázy. Tato varianta ovlivňuje kanonické sestřihové místo intronu 10, což vede k přeskočení exonu 10 na úrovni mRNA (r.703\_869del167). Jedná se o posun čtecího rámce p.Val235GlyfsTer22. Dále byla zaznamenána vzácná varianta c.347C>T, která mění konzervovanou aminokyselinu p.Pro116Leu (Calvete *et al.*, 2017) u pacienta, který má také zároveň delecí 5395 bp ovlivňující exon 9 a 10 genu *CHEK2* (NM\_007194). Funkční analýza, kterou provedli naši kolegové z ÚMG AVČR (laboratoř Dr. Macůrka) prokázala, že POT1-P116L je sice schopen interakce se svým vazebným partnerem v shelterinovém komplexu, proteinem ACD, avšak ztrácí schopnost vazby na telomerázovou DNA.

**Obrázek 13.** Charakterizace sestřihové aberace v genu *CDKN2A*. **A.** NGS analýza RNA izolované z krve. Sestřihová aberantní varianta c.457+4\_457+5delAG (označená šedou šipkou). Varianta vede k eliminaci kanonického sestřihového místa a aktivaci kryptického sestřihového místa uvnitř exonu 2, což vede k delecí 74 nukleotidů (r.384\_457del74) na úrovni mRNA a zařazení předčasného stop kodónu na úrovni proteinu p.Tyr129HisfsTer11. **B.** Sashimi plot, který ukazuje přítomnost aberantního sestřihu u pacienta (5/12 readů).



Jeden pacient nesl mutaci v genu *ACD* (NM\_001082486) c.755delA (p.Asp255AlafsTer9). *ACD* kóduje protein, který je součástí shelterinového komplexu, PV v genech tohoto komplexu jsou asociované s vysokým rizikem vzniku melanomu (*Aoude et al.*, 2015b). V genu *ACD* byla nalezena také varianta c.617dupT (p.His206GlnfsTer26) v kontrolní skupině. Žádné varianty nebyly nalezeny v dalších genech popsáných se zvýšeným rizikem familiárního melanomu *TERT*, *BAP1* nebo *CDK4*.

#### 4.1.2. Mutace v genech s nízkým rizikem pro vznik melanomu

V genech s nízkým rizikem vzniku melanomu bylo nalezeno celkem 12 nosičů mutací v pěti genech. Tyto geny patrně nezvyšují riziko vzniku melanomu klinicky významným způsobem, nicméně frekvence výskytu u pacientů oproti kontrolám byla vyšší v genech *TYRP1* (0,8 % vs. 0 %;  $p=0,02$ ) a *OCA2* (2,3 % vs. 0,5 %;  $p=0,01$ ) kódujících specifické proteiny melanogeneze (viz kapitola 1.2.1).

#### 4.1.3. Mutace v genech asociovaných s dalšími hereditárními onemocněními

Celkem u 22/264 (8,3 %) pacientů a 57/1479 kontrol (3,9 %) byly nalezeny patogenní varianty v dalších nádorových predispozičních genech. Alterace postihující geny *NBN* (OR=10; 95%CI 2,5-47,0;  $p=3,2 \times 10^{-4}$ ) a *BRCA2* (OR=9,5; 95%CI 1,8-61,4;  $p=0,003$ ) vykazovaly nejsilnější asociaci s melanomem. Frekvence zárodečných mutací v genech *BRCA1*, *CHEK2* a *MUTYH* byly třikrát vyšší u pacientů než u kontrol, ale jednalo se o hraničně nesignifikanční nárůst (celkově  $p=0,051$ ).

#### 4.1.4. Mutace v ostatních genech s neznámým rizikem pro vznik melanomu

Patogenní varianty v dalších 23 genech byly nalezeny u 28/264 (10,7 %) pacientů (tabulka 6) a 132/1479 (8,9 %) kontrol ( $p=0,4$ ), což naznačuje, že tyto geny pravděpodobně se zvýšeným rizikem vzniku melanomu významně nesouvisejí.

**Tabulka 6:** Zárodečné P/LP varianty v genech s neznámým rizikem pro vznik melanomu.

|   | Gen: kódující sekvence (proteinová sekvence)     | Lokalizace melanomu (věk) | Ostatní nádory probanda (věk)  | Rodinná nádorová anamnéza (kolikrát)                      |
|---|--|---------------------------|--------------------------------|---|
| M | <i>BLM</i> :c.1642C>T(p.Gln548Ter)               | Trup (28)                 | Mel (41, 43)                   | negativní   |
| Ž | <i>CASP10</i> :c.684+1G>A                        | DK (60)                   | UtC (67)                       | CRC (1×), HCC (1×), Mel (1×), PC (1×), PrC (1×), TsC (1×) |
| Ž | <i>CDKN1C</i> :c.644_649dup6(p.Ala215_Pro216dup) | Trup (37)                 | Mel (45)                       | Mel (1×), PrC (1×), RC (2×), SC (1×)                      |
| Ž | <i>CYP11A1</i> :c.1371delT(p.Cys457Ter)          | HK (40)                   | -                              | Mel (1×), OC (1×), PC (1×)                                |
| Ž | <i>CYP3A5</i> :c.1372del(p.Val458SerfsTer)       | DK (38)                   | HL                             | UrC (1×)  |
| M | <i>DCAF4</i> :c.1294+1G>A                        | n.a. (40)                 | -                              | Mel (1×), PrC (1×)  |
| Ž | <i>ERCC2</i> :c.1808_1809del(p.Lys603SerfsTer45) | n.a. (18)                 | -                              | BC (1×), BT (1×), ENT_C (1×)                              |
| Ž | <i>ERCC3</i> :c.325C>T(p.Arg109Ter)              | Trup (21)                 | -                              | negativní   |
| M | <i>ERCC6</i> :c.653-2A>G                         | n.a. (59)                 | PaC (67)<br>PrC (55)           | n.a.  |
| Ž | <i>FANCM</i> :c.5101C>T(p.Gln1701Ter)            | Trup (36)                 | -                              | BC (1×), GC (2×), LxC (1×), SgC (1×)                      |
| Ž | <i>FLCN</i> :c.30del(p.Cys11AlafsTer44)          | Trup (16)                 | -                              | negativní   |
| Ž | <i>IFIH</i> :c.688C>T(p.Gln230Ter)               | HK (49)                   | BC (53; 53)<br>UtC (72)        | BC (1×), Mel (1×)   |
| Ž | <i>MMP1</i> :c.1389G>A(p.Trp463Ter)              | Trup (34)                 | -                              | CRC (4×)  |
| Ž | <i>MUTYH</i> :c.536A>G(p.Tyr179Cys)              | n.a. (30)                 | BC (29)                        | BT (1×)   |
| Ž | <i>MUTYH</i> :c.536A>G(p.Tyr179Cys)              | HK (58)                   | -                              | CRC (3×), TC (1×)   |
| Ž | <i>MUTYH</i> :c.1147del(p.Ala385ProfsTer23)      | n.a. (41)                 | BC (43)                        | BC (1×), OC (1×)  |
| Ž | <i>MUTYH</i> :c.1187G>A(p.Glu396Asp)             | n.a. (46)                 | Ly (39)<br>BC (47)<br>SkC (49) | LC (1×), Mel (1×)   |
| Ž | <i>MYH7B</i> :c.4733ins (p.Lys1579GlnfsTer10)    | HK (29)                   | -                              | CC (1×), LxC (1×)   |
| Ž | <i>NFKBIE</i> :c.137del(p.Ile46ThrfsTer3)        | Trup (42)                 | BC (42)<br>CRC (53)            | BC (1×)   |

|   |                                       |            |                      |  |
|---|---------------------------------------|------------|----------------------|--|
| M | <i>POLH</i> :c.884+1_884+4del         | Trup (33)  | Mel (35)<br>SkC (29) | LC (1×)  |
| M | <i>PRF1</i> :c.386G>A (p.Trp129Ter)   | DK (41)    | -                    | LC (1×), PC (1×)                               |
| Ž | <i>RECQL4</i> :c.1859C>G(p.Ser620Ter) | HK (17)    | -                    | BC (1×), CRC (1×), TC (1×), neznámý nádor (1×) |
| Ž | <i>RECQL4</i> :c.2161C>T(p.Arg721Ter) | Hlava (38) | Mel (37)             | EC (1×)  |
| Ž | <i>SLX4</i> :c.2384C>G(p.Ser795Ter)   | HK (26)    | -                    | Negativní                                      |
| M | <i>SLX4</i> :c.5242C>T(p.Gln1748Ter)  | Trup (33)  | -                    | CRC (1×), osteosarkom (1×), PrC (1×)           |
| F | <i>XPC</i> :c.622-2A>G                | Hlava (30) | -                    | PC (3×)  |
| Ž | TRPM1:Δe2-7                           | Trup (41)  | BC (45)              | BC (1×), mesotheliom (1×), SC (2×)             |
| Ž | TRPM1: Δe2-7                          | Trup (58)  | BC (62, 62)          | BC (1×), LC (1×)                               |

M - muž; Ž - žena; DK - dolní končetina, HK - horní končetina; BC (breast cancer) – karcinom prsu, BT (brain tumor) – nádor mozku, CC (cervix cancer) – nádor dělohy, CRC (colorectal cancer) – kolorektální karcinom, EC (endometrial cancer) – karcinom endometria, ENT\_C (ear, nose, throat cancer) – nádor ucha, nosu a krku, GbC (Gallbladder cancer) – karcinom žlučníku a žlučového, GC (gastric cancer) – karcinom žaludku, HCC (hepatocellular cancer) – nádor jater, LC (lung cancer) – karcinom plic, LxC (laryngeal cancer) – nádor laryngu, Mel (melanoma) – melanom, n.a. (not available) – není k dispozici, OC (ovarian cancer) – karcinom ovaria, PC (pancreatic cancer) – karcinom pankreatu, PrC (prostate cancer) – karcinom prostaty, RC (renal cancer) – karcinom ledviny, SC (skin cancer) – karcinom kůže, SGC (salivary gland cancer) – karcinom slinných žláz, TC (thyroid cancer) – karcinom štítné žlázy, TsC (testicular cancer) – nádor varlat, UrC (urinary cancer) – karcinom močového měchýře, UtC (uterine cancer) – nádor dělohy

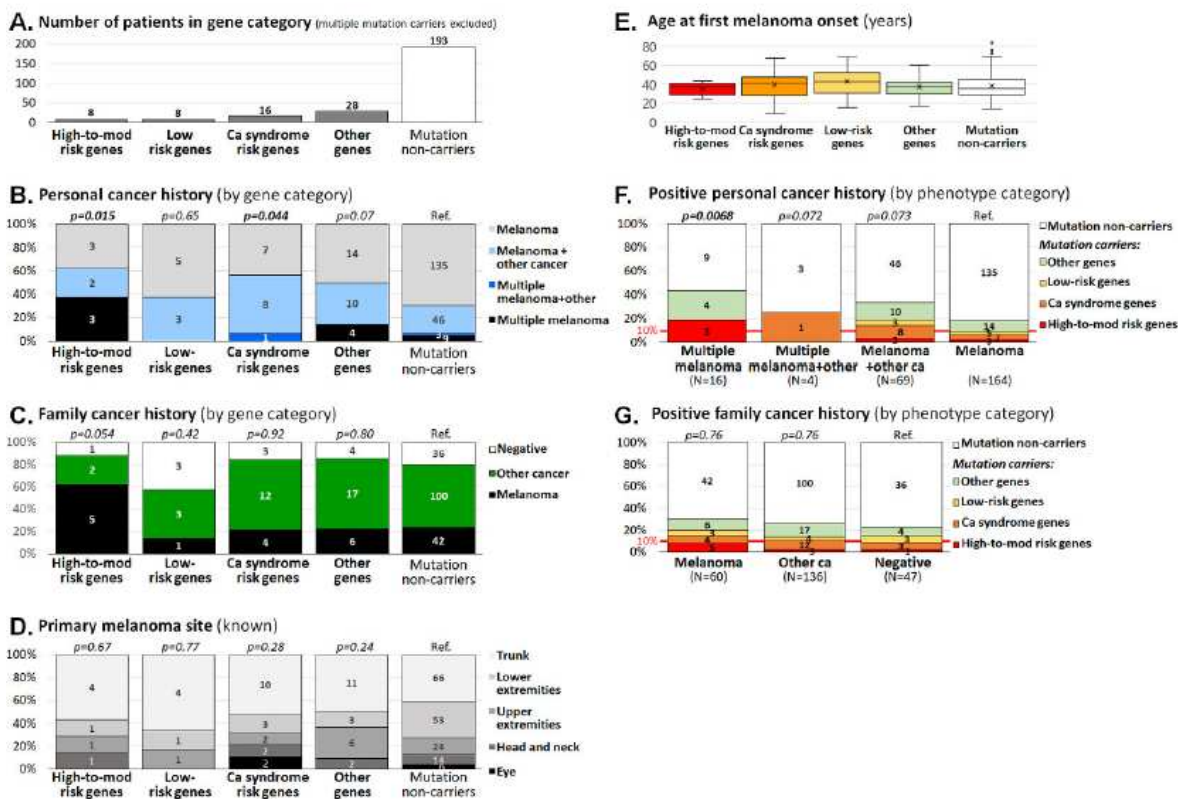
#### 4.1.5. Klinicko-patologické charakteristiky pacientů s melanomem

Z klinicko-patologické charakteristiky bylo vyřazeno 11 pacientů nesoucích dvě a více patogenních variant v predispozičních genech. Analyzováno bylo tedy celkem 60 nosičů patogenních variant v některém z hodnocených genů a 193 pacientů bez přítomnosti patogenní varianty (viz [obrázek 14](#)).

Klasifikace podle přítomnosti mutací ve skupinách predisponujících k melanomu (pode [Tabulky 7](#)) odhalily zvýšenou frekvenci pacientů s mnohonásobným melanomem nebo dvěma primárními tumory mezi nosiči mutací genů s vysokým až středním rizikem pro vznik melanomu (5/8; 63 % pacientů) a u genů pro hereditární nádorové syndromy (9/16; 56 % pacientů), v porovnání s nenosiči (58/193; 30 % pacientů; [obrázek 14B](#)). Důležitost osobní nádorové anamnézy pro potenciální nosičství mutace byla prokázána, když jsme vypočítali podíl pacientů se zárodečnou mutací v konkrétních kategoriích osobní nádorové anamnézy (viz [obrázek 14F](#)). Signifikantní nárůst podílu nosičů mutací byl nalezen při porovnání pacientů s mnohonásobným melanomem (7/16; 44 % pacientů) s pacienty s jedním melanomem (29/164; 18 % pacientů,  $p=0,021$ ). Celkem 14/89 (16 %) pacientů, kteří měli více než jeden tumor v osobní anamnéze (pacienti s mnohonásobným melanomem, mnohonásobným melanomem a jiným nádorem a pacienti s nádorovou duplicitou melanomu a dalšího tumoru) bylo nosiči patogenních variant v klinicky relevantním genu (geny s vysokým až středním rizikem, nebo geny pro nádorové hereditární syndromy), v porovnání

s 10/164 (6 %) nosiči u pacientů s jedním melanomem ( $p=0,023$ ). Nádorová duplicita (ne pouze melanomová) u probandů zvyšuje riziko nosičství patogenní varianty (OR=2,9; 95%CI 1,2-6,8). Pozitivní rodinná nádorová anamnéza nezvyšovala riziko nosičství mutace, nicméně prevalence mutací u pacientů s pozitivní nádorovou anamnézou (24/196 nosičů; 12 %, **obrázek 14C** a **14G**) překročila limit 10 % pro zařazení ke genetickému testování (4/47, 8,5 % pozitivně testovaných pacientů bez rodinné nádorové anamnézy;  $p=0,6$ ).

**Obrázek 14.** Klinicko-patologické charakteristiky pacientů s melanomem rozdělených na základě přítomnosti patogenních zárodečných predispozičních variant. **A.** Počet pacientů podle kategorií genů (zobrazených i na panelu **B**, **C** a **G**). *P*-hodnoty vyjadřují statistickou signifikanci vůči nenosičům (považovaných jako reference). Panel **E** ukazuje věky pacientů v jednotlivých kategoriích. Panel **F** a **G** zobrazuje podíl nosičů variant v analyzovaných kategoriích genů u jedinců s osobní nádorovou anamnézou (**F**; s výjimkou 11 nosičů více patogenních variant) a jedinců s pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou (**G**; s výjimkou 21 jedinců s neznámou rodinnou nádorovou anamnézou).



**Tabulka 7.** Frekvence zárodečných patogenních variant ve skupinách s geny predisponujících k melanomu. Hodnocení je zobrazeno pro analýzu, kdy 11 nosičů dvou a více germinálních variant bylo zahrnuto nebo vynecháno z analýzy.

| Melanomové podskupiny  | P/LP Varianty; N (%) |              | OR (95%CI); <i>p</i> -hodnota           |
|--|----------------------|--------------|---|
|  | 264 pacientů         | 1479 kontrol |   |
| <b>Analýza, kdy vícenásobní nosiči mutací byli ZAHRNUTI*</b> |                      |              |   |
| Geny s vysokým až středním rizikem pro vznik melanomu        | 9 (3,4)              | 1 (0,1)      | 52,2 (6,6-413,1); $3,2 \times 10^{-7}$  |
| Geny s nízkým rizikem pro vznik melanomu                     | 12 (4,5)             | 35 (2,4)     | 1,9 (1,0-3,8); 0,06                     |
| Geny pro hereditární nádorové syndromy                       | 22 (8,3)             | 57 (3,9)     | 2,3 (1,4-3,8); 0,003                    |
| Geny s neznámým rizikem pro vznik familiárního melanomu      | 28 (10,6)            | 132 (8,9)    | 1,2 (0,8-1,8); 0,4                      |
| <b>Analýza, kdy vícenásobní nosiči mutací byli VYŘAZENI</b>  |                      |              |   |
| Geny s vysokým až středním rizikem pro vznik melanomu        | 8 (3,2)              | 1 (0,1)      | 48,1 (6,4-2116,9); $1,5 \times 10^{-6}$ |
| Geny s nízkým rizikem pro vznik melanomu                     | 8 (3,2)              | 35 (2,4)     | 1,3 (0,5-3,0); 0,51                     |
| Geny pro hereditární nádorové syndromy                       | 16 (6,3)             | 57 (3,9)     | 1,7 (0,9-3,0); 0,09                     |
| Geny s neznámým rizikem pro vznik familiárního melanomu      | 28 (10,6)            | 132 (8,9)    | 1,2 (0,8-1,8); 0,4                      |

\* U vícenásobných nosičů variant, kteří měli varianty v genech z různých skupin, se započítávala skupina s vyšším rizikem vzniku melanomu. Geny s vysokým až středním rizikem > geny pro hereditární nádorové syndromy > geny s nízkým rizikem pro vznik melanomu > geny s neznámým rizikem pro vznik familiárního melanomu

Vícenásobní nosiči mutací 7/11 (kteří byli vyřazeni z klinicko-patologické analýzy), byly nosiči mutací, kde alespoň jedna byla v genu ze skupiny s vysokým až středním rizikem (*POT1/CHEK2*), nebo ze skupiny pro hereditární nádorové syndromy (*ATM/WRN*,  $2 \times$  *BRCA1/BRCA2*, *CHEK2/RAD51D/NBN*). Melanom nebo tumorová multiplicita v osobní nádorové anamnéze byla přítomna u čtyřech (36 %) pacientů, všichni tyto pacienti měli pozitivní rodinnou anamnézu.

V rámci této studie jsem se podílela na přípravě většiny sekvenačních knihoven s panelem CZMELAC, analýze nabohacení sekvenačních knihoven pomocí qPCR, analyzovala jsem CNV výstupy z CNV kitu, konfirmovala jsem patogenní varianty pomocí Sangerova sekvenování, v případě CNV variant pomocí qPCR. Podílela jsem se na filtraci a prioritizaci variant, včetně analýzy těchto variant v IGV. Dále jsme pracovala na statistickém vyhodnocení výsledků genotypových a fenotypových analýz, připravovala grafické a tabulkové podklady pro publikaci a podílela se na přípravě rukopisu a jeho podání.

## 4.2. Analýza nádorové predispozice u pacientek s karcinomem endometria

ONCOLOGY LETTERS 25: 216, 2023

### Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer

JAN KRAL<sup>1</sup>, SANDRA JELINKOVA<sup>1</sup>, PETRA ZEMANKOVA<sup>1,2\*</sup>, MICHAL VOCKA<sup>3,4\*</sup>, MARIANNA BORECKA<sup>1\*</sup>, LEONA CERNA<sup>5\*</sup>, MARTA CERNA<sup>1\*</sup>, LUKAS DOSTALEK<sup>6</sup>, PETRA DUSKOVA<sup>7\*</sup>, LENKA FORETOVA<sup>8\*</sup>, ONDREJ HAVRANEK<sup>4,9\*</sup>, KLARA HORACKOVA<sup>1</sup>, MILENA HOVHANNISYAN<sup>1</sup>, STEPAN CHVOJKA<sup>5\*</sup>, MARTA KALOUSOVA<sup>1</sup>, MARCELA KOSAROVA<sup>10\*</sup>, MONIKA KOUDOVA<sup>5\*</sup>, VERA KRUTILKOVA<sup>11\*</sup>, EVA MACHACKOVA<sup>8\*</sup>, PETR NEHASIL<sup>1,2,12\*</sup>, JAN NOVOTNY<sup>4\*</sup>, BARBORA OTAHALOVA<sup>1,13</sup>, ALENA PUCHMAJEROVA<sup>5\*</sup>, MARKETA SAFARIKOVA<sup>1</sup>, JIRI SLAMA<sup>6</sup>, VIKTOR STRANECKY<sup>12\*</sup>, IVAN SUBRT<sup>14\*</sup>, SPIROS TAVANDZIS<sup>11\*</sup>, MICHAL ZIKAN<sup>15</sup>, TOMAS ZIMA<sup>1</sup>, JANA SOUKUPOVA<sup>1\*</sup>, PETRA KLEIBLOVA<sup>1,4\*</sup>, ZDENEK KLEIBL<sup>1,2\*</sup> and MARKETA JANATOVA<sup>1\*</sup>

Genetickému testování pomocí panelu CZECANCA jsme podrobili vzorky od 527 pacientek s nádory endometria, které zahrnovaly 249 pacientek splňujících indikační kritéria pro genetické testování Lynchova syndrom (LS), syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria (HBOC), nebo obou (LS + HBOC) a 278 vzorků od pacientek, která nesplňovala daná kritéria.

#### 4.2.1. Zárodečné patogenní varianty v predispozičních genech pro tumory endometria

Frekvence patogenních variant nalezená v predispozičních genech pro karcinom endometria byla čtyřikrát vyšší u pacientek (60/527; 11,4 %) než u kontrol (46/1662; 2,8 %;  $p=9,7 \times 10^{-16}$ ) (tabulka 8 a tabulka 9). Patogenní varianty v genech pro Lynchův syndrom byly nalezeny u 27/527 (5,1 %) pacientek (polovina z nich byly nosičky patogenních variant v genu *MSH6*) a u 4/1662 (0,25 %) kontrol, což ukazuje, že varianty v genech Lynchova syndromu představují nejvyšší genetické riziko karcinomu endometria (OR=22,4;  $p=1,8 \times 10^{-17}$ ). Ze skupiny genů Lynchova syndromu jsme nenalezli žádné patogenní varianty v genu *PMS2*.

Geny *BRCA1*, *BRCA2* a *CHEK2* měly největší frekvenci patogenních variant z HBOC genů a jejich výskyt u pacientek s tumory endometria byl signifikantně vyšší než u kontrol. Nicméně, riziko onemocnění v porovnání s nosičkami mutací v genech Lynchova syndromu bylo významně nižší (tabulka 9). Patogenní varianty v ostatních HBOC genech nebyly zaznamenány, nebo nebyly čtenější než u kontrol (tabulka 8 a tabulka 9). Dvě



pacientky byly nosičkami patogenních variant ve dvou klinicky relevantních genech (*MLH1/BRCA1* a *MSH2/ATM*).

**Tabulka 8.** Frekvence zárodečných patogenních variant v predispozičních genech pro nádory endometria, na základě rozdělení do indikačních skupin.

| Skupina genů         | Geny                      | Indikace pro genetické testování |                        |                          |                                |
|----------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|
|                      |                           | LS, (N=151)<br>n (%)             | HBOC, (N=16)<br>n (%)  | LS+HBOC<br>(N=82); n (%) | Neindikované<br>(N=278); n (%) |
| Lynchův syndrom (LS) | <i>MLH1</i> <sup>a</sup>  | 3 (2,0)                          | 0                      | 2 (2,4) <sup>a</sup>     | 1 (0,4)                        |
|                      | <i>MSH2</i> <sup>b</sup>  | 6 (4,0)                          | 0                      | 2 (2,4)                  | 0                              |
|                      | <i>MSH6</i>               | 8 (5,3)                          | 0                      | 1 (1,2)                  | 4 (1,4)                        |
|                      | <i>PMS2</i>               | 0                                | 0                      | 0                        | 0                              |
|                      | <i>EPCAM</i>              | 0                                | 0                      | 0                        | 0                              |
|                      | Všechny geny LS           | 17 (11,3)                        | 0                      | 5 (6,1)                  | 5 (1,8)                        |
| HBOC                 | <i>ATM</i> <sup>b</sup>   | 1 (0,7) <sup>b</sup>             | 0                      | 1 (1,2)                  | 3 (1,1)                        |
|                      | <i>BARD1</i>              | 0                                | 0                      | 1 (1,2)                  | 0                              |
|                      | <i>BRCA1</i> <sup>a</sup> | 2 (1,3)                          | 2 (12,5)               | 6 (7,3) <sup>a</sup>     | 1 (0,4)                        |
|                      | <i>BRCA2</i>              | 1 (0,7)                          | 1 (6,3)                | 0                        | 5 (1,8)                        |
|                      | <i>BRIP1</i>              | 0                                | 0                      | 0                        | 1 (0,4)                        |
|                      | <i>CDH1</i>               | 0                                | 0                      | 0                        | 0                              |
|                      | <i>CHEK2</i>              | 3 (2,0)                          | 0                      | 1 (1,2)                  | 2 (0,7)                        |
|                      | <i>NF1</i>                | 0                                | 0                      | 0                        | 0                              |
|                      | <i>PALB2</i>              | 1 (0,7)                          | 0                      | 0                        | 0                              |
|                      | <i>PTEN</i>               | 1 (0,7)                          | 0                      | 0                        | 0                              |
|                      | <i>RAD51C</i>             | 0                                | 0                      | 2 (2,4)                  | 0                              |
|                      | <i>RAD51D</i>             | 0                                | 0                      | 0                        | 0                              |
|                      | <i>STK11</i>              | 0                                | 0                      | 0                        | 0                              |
|                      | <i>TP53</i>               | 0                                | 0                      | 0                        | 0                              |
| Všechny HBOC geny    | 9 (6,0)                   | 3 (18,8)                         | 11 (13,4)              | 12 (4,3)                 |                                |
| Všechny PV           | 26                        | 3                                | 16                     | 17                       |                                |
| Všichni nosiči       | 25 (16,6)                 | 3 (18,8)                         | 15 (18,3) <sup>a</sup> | 17 (6,1)                 |                                |

<sup>a</sup> nosiči dvou patogenních variant *MLH1/BRCA1* <sup>b</sup> nosiči dvou patogenních variant *MSH2/ATM*

**Tabulka 9.** Frekvence zárodečných patogenních variant v 19 predispozičních genech pro nádory endometria

| Skupina genů | Geny                      | Všichni pacienti s EC,<br>n (%); (N=527) | Kontroly, n (%);<br>(N=1662) | OR (95 % CI); <i>p</i> -hodnoty        |
|--------------|---------------------------|--|------------------------------|--|
| LS           | <i>MLH1</i> <sup>a</sup>  | 6 (1,1) <sup>a</sup>                     | 1 (0,1)                      | 19,1 (2,3-159,1); 1,3×10 <sup>-4</sup> |
|              | <i>MSH2</i> <sup>b</sup>  | 8 (1,5) <sup>b</sup>                     | 0                            | N.A.                                   |
|              | <i>MSH6</i>               | 13 (2,4)                                 | 0                            | N.A.                                   |
|              | <i>PMS2</i>               | 0  | 3 (0,2)                      | N.A.                                   |
|              | <i>EPCAM</i>              | 0  | 0                            | N.A.                                   |
|              | Všechny LS geny           | 27 (5,1)                                 | 4 (0,2)                      | 22,4 (7,8-64,3); 1,8×10 <sup>-17</sup> |
| HBOC         | <i>ATM</i> <sup>b</sup>   | 5 (1,0) <sup>b</sup>                     | 7 (0,4)                      | 2,3 (0,2-7,2); 0,2                     |
|              | <i>BARD1</i>              | 1 (0,2)                                  | 0                            | N.A.                                   |
|              | <i>BRCA1</i> <sup>a</sup> | 11 (2,1) <sup>a</sup>                    | 9 (0,5)                      | 3,9 (1,6-9,5); 1,0×10 <sup>-3</sup>    |
|              | <i>BRCA2</i>              | 7 (1,3)                                  | 3 (0,2)                      | 7,4 (1,9-28,9); 2,0×10 <sup>-3</sup>   |
|              | <i>BRIP1</i>              | 1 (0,2)                                  | 3 (0,2)                      | 1,1 (0,1-10,1); >0,9                   |
|              | <i>CDH1</i>               | 0  | 0                            | N.A.                                   |
|              | <i>CHEK2</i>              | 6 (1,1)                                  | 6 (0,4)                      | 3,2 (1,0-9,9); 4,0×10 <sup>-2</sup>    |
|              | <i>NF1</i>                | 0  | 1 (0,1)                      | N.A.                                   |
|              | <i>PALB2</i>              | 1 (0,2)                                  | 8 (0,5)                      | 0,4 (0,1-3,1); 0,4                     |
|              | <i>PTEN</i>               | 1 (0,2)                                  | 1 (0,1)                      | 3,2 (0,2-50,5); 0,4                    |
|              | <i>RAD51C</i>             | 2 (0,4)                                  | 2 (0,1)                      | 3,2 (0,4-22,5); 0,2                    |
|              | <i>RAD51D</i>             | 0  | 0                            | N.A.                                   |
|              | <i>STK11</i>              | 0  | 0                            | N.A.                                   |
|              | <i>TP53</i>               | 0  | 2 (0,1)                      | N.A.                                   |

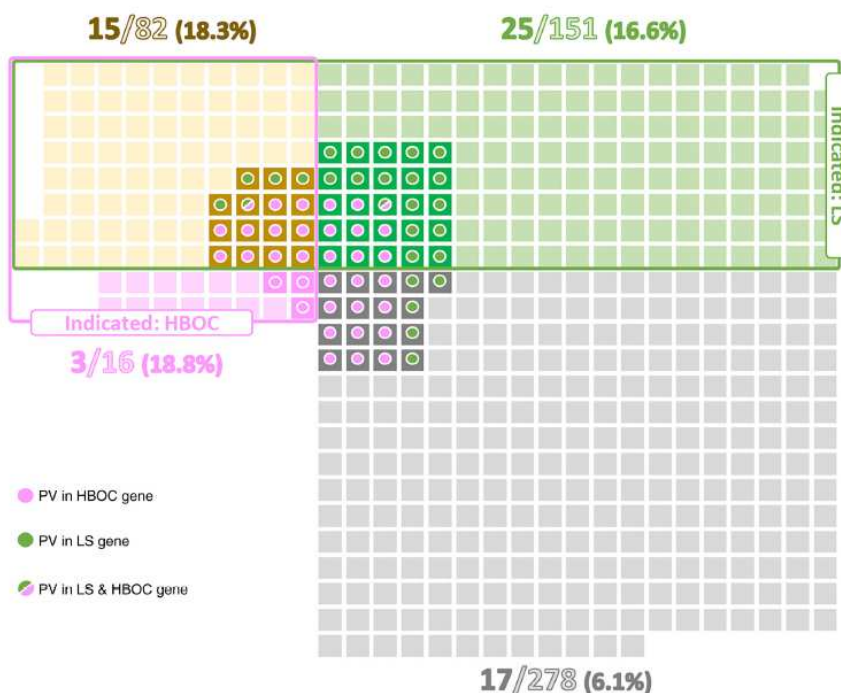
|  |                   |                          |          |                                     |
|--|-------------------|--------------------------|----------|-------------------------------------|
|  | Všechny HBOC geny | 25 (6,6) <sup>b</sup>    | 42 (2,5) | 2,7 (1,7-4,3); $7,9 \times 10^{-5}$ |
|  | Všechny PV        | 62                       | 46       |                                     |
|  | Všichni nosiči    | 60 (11,4) <sup>a b</sup> | 46 (2,8) |                                     |

<sup>a</sup> nosiči dvou patogenních variant *MLH1/BRCA1* <sup>b</sup> nosiči dvou patogenních variant *MSH2/ATM*

#### 4.2.2. Indikační kritéria pro identifikaci nosiček patogenních variant

Podíl patogenních variant u pacientek s karcinomem endometria, které splňují kritéria pro Lynchův syndrom, hereditárním syndrom karcinomu prsu a ovaria nebo obou syndromů, byl podobný (16,6 %, 18,8 % a 18,3 %), avšak trojnásobný v porovnání s pacientkami, která kritéria pro testování nesplňovala (6,1 %, **obrázek 15**). Podle očekávání byl nejvyšší podíl patogenních variant v genech Lynchova syndromu (11,3 %) ve skupině pacientek splňující kritéria jeho testování. Stejně tomu bylo i u pacientek s patogenními variantami v HBOC genech. Zatímco alterace v genech s vysokou penetrancí (*MLH1*, *MSH2* a *BRCA1*) dominovaly ve skupině pacientek splňujících obě kritéria (LS+HBOC), skupina pacientek neindikovaných na základě příslušnosti k těmto kritériím se vyznačovala četnější přítomností v genech se střední penetrancí (*MSH6* a *ATM*).

**Obrázek 15.** Distribuce patogenních variant ve skupině pacientek, které splňují kritéria pro genetické testování Lynchova syndromu (LS) či hereditárního syndromu karcinomu prsu a ovaria (HBOC). Barevné čtverce představují jednotlivé pacienty. Kroužky označují nosičky patogenních variant v genech pro LS (zelené), pro HBOC (růžová) nebo obou (zelená a růžová).



#### 4.2.3. Zárodečné patogenní varianty v ostatních kandidátních genech

Ve zbývajících kandidátních genech byly nalezeny patogenní varianty ve 48/207 genů. Frekvence těchto variant byla vyšší u pacientek s karcinomem endometria (66/527; 12,5 %) než u kontrol (139/1662; 8,4 %;  $p=0,004$ ). Osm pacientek s karcinomem endometria (žádné kontroly) neslo patogenní varianty současně v predispozičních genech pro karcinom endometria a v ostatních kandidátních genech.

Nejčastější byly varianty v genu *MUTYH* (monoalelické varianty u 5/467; 1,1 %) a *FANCA* (4/467; 0,8 %). Jejich frekvence se však nelišily od kontrol (*MUTYH* – 18/1616; 1,1 %; *FANCA* – 10/1616; 0,6 %). Tři pacientky nesly zárodečné trunkační varianty v genech, které kódují DNA polymerázy (dvě pacientky s *POLE* a jedna s *POLD1*) - tyto varianty byly s karcinomem endometria spojovány už dříve (Spurdle *et al.*, 2017), na druhou stranu u kontrol žádná varianta v *POLE* či *POLD1* nebyla nalezena. Celková frekvence patogenních variant v genech pro DNA polymerázy byla významně vyšší u pacientek s karcinomem endometria (bez pacientek s variantami v predispozičních genech) než u kontrol (3/467; 0,6 % ve srovnání s 1/1616; 0,06 %; OR=10,44; 95 % CI 1,08-100,51;  $p=0,012$ ).

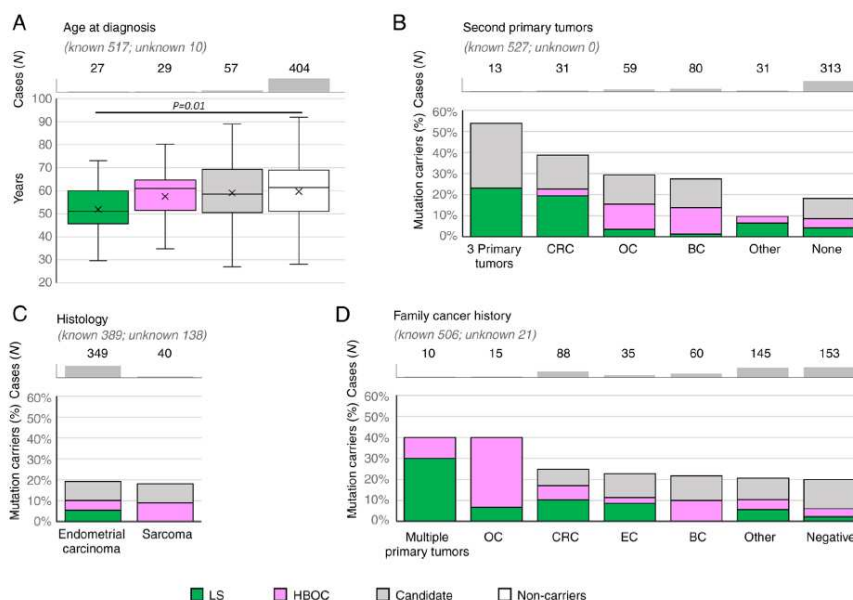
U pacientek, které splňují kritéria pro genetické testování pro oba syndromy (LS + HBOC), byla frekvence patogenních variant v ostatních kandidátních genech 14/67 (20,9 %).

#### 4.2.4. Klinicko-patologická charakteristika u nosičů patogenních zárodečných variant

Medián věku v době diagnózy nádoru endometria byl signifikantně nižší u pacientek s variantami v genech Lynchova syndromu oproti nenosičkám (51,0 let vs. 61,4 let;  $p=0,01$ , viz [obrázek 16A](#)). Celková frekvence patogenních variant v predispozičních genech pro nádory endometria byla stejná u pacientek s karcinomy i sarkomy (39/349; 11 % vs. 4/40; 10 %, [obrázek 16C](#)), avšak sarkomy se nevyskytovaly u pacientek s patogenními variantami v genech Lynchova syndromu. Dvě pacientky (z osmi) byly diagnostikovány s endometriální intraepiteliální neoplasií (EIN), tyto pacientky byly nosičky PV v genu *BRCAl*. Analýza pacientek s dalším nádorem v osobní anamnéze (viz [obrázek 16B](#)) odhalila nejvyšší frekvenci PV v predispozičních genech pro karcinom endometria u pacientek se třemi nádory a u pacientek s kolorektálním karcinomem, jako druhým nádorem. Nosičky PV

v LS genech měly zvýšenou frekvenci u pacientek s karcinomem endometria a kolorektálním karcinomem a třemi nádory v osobní anamnéze. Všech 13 pacientek se třemi nádory v osobní anamnéze vyvinulo buď kolorektální karcinom (N=5) a/nebo ovariální karcinom (N=10). Nosičky patogenních variant v genech pro HBOC byly dle očekávání nejvíce zastoupeny u pacientek s karcinomem endometria a karcinomem ovaria/karcinomem prsu. Z pohledu rodinné anamnézy bylo nejvyšší zastoupení nosiček patogenních variant v predispozičních genech pro nádory endometria u malé skupiny pacientek s výskytem karcinomu ovaria nebo u pacientek s vícečetným výskytem nádorů v rodinné anamnéze (**obrázek 16D**).

**Obrázek 16.** Relativní podíl nosiček patogenních variant v klinicko-patologických podskupinách a to konkrétně **A.** věk v době diagnózy, **B.** druhé primární nádory, **C.** histologie nádorů, **D.** rodinná nádorová anamnéza.



Prevalence nosiček patogenních variant u kandidátních predispozičních genů se nelišila od nenosiček v žádné z klinicko-patologických charakteristik.









V rámci této studie jsem se podílela na izolaci DNA a RNA od pacientek, přípravě sekvenčních knihoven s panelem CZECANCA, analýze nabohacení sekvenčních knihoven pomocí qPCR a analýze CNV výstupy z CNV kitu. Dále jsem se podílela na vyhodnocování variant a jejich filtraci a analýzu pomocí IGV. Částečně jsem se podílela na konfirmaci patogenních variant pomocí Sangerova sekvenování.

### 4.3. Analýza nádorové predispozice u pacientek s karcinomem ovaria



Article

## Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer

Klara Lhotova <sup>1,2</sup>, Lenka Stolarova <sup>1</sup>, Petra Zemankova <sup>1,2</sup>, Michal Vocka <sup>3</sup> , Marketa Janatova <sup>1,2</sup>, Marianna Borecka <sup>1,2</sup> , Marta Cerna <sup>1</sup>, Sandra Jelinkova <sup>1</sup>, Jan Kral <sup>1</sup>, Zuzana Volkova <sup>1</sup>, Marketa Urbanova <sup>2</sup>, Petra Kleiblova <sup>2</sup> , Eva Machackova <sup>4</sup>, Lenka Foretova <sup>4</sup>, Jana Hazova <sup>4</sup>, Petra Vasickova <sup>4</sup>, Filip Lhota <sup>5</sup>, Monika Koudova <sup>5</sup> , Leona Cerna <sup>5</sup>, Spiros Tavandzis <sup>6</sup> , Jana Indrakova <sup>6</sup>, Lucie Hruskova <sup>7</sup>, Marcela Kosarova <sup>8</sup>, Radek Vrtel <sup>9</sup>, Viktor Stranecky <sup>10</sup>, Stanislav Kmoch <sup>10</sup>, Michal Zikan <sup>11</sup>, Libor Macurek <sup>12</sup> , Zdenek Kleibl <sup>1</sup>  and Jana Soukupova <sup>1,2,\*</sup> 

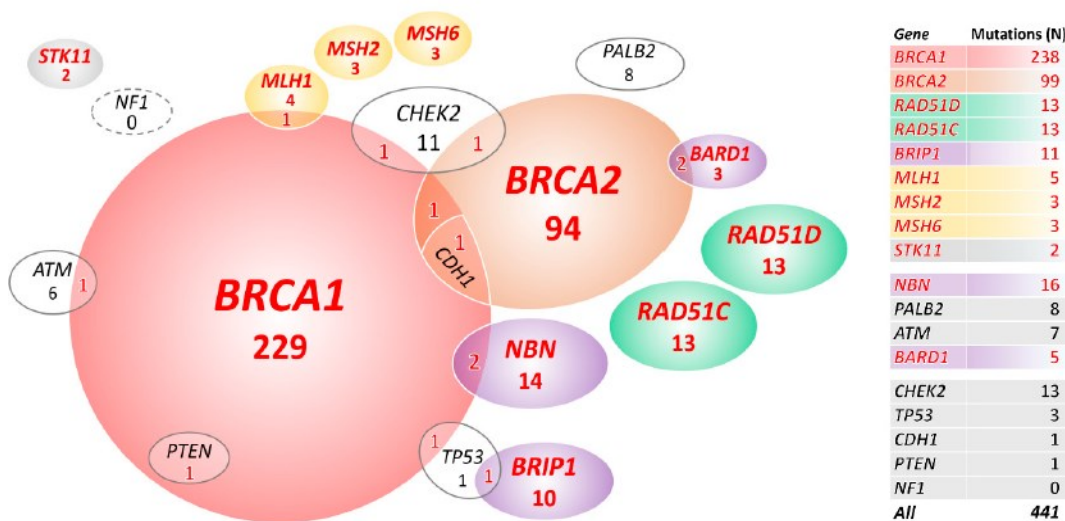
Do analýzy bylo zařazeno 1333 pacientek s nádory ovaria diagnostikovanými v sedmi centrech, které byly geneticky analyzovány pomocí NGS panelem CZECANCA. Pacientek, které byly diagnostikovány pouze s karcinomem ovaria, bylo 1045 (78,4 %) a u 288 (21,6 %) žen byla diagnostikována nádorová duplicita, z toho u 210 (15,8 %) pacientek karcinom prsu a u 78 (5,9 %) pacientek jiné nádorové onemocnění. Medián věku pacientek s karcinomem ovaria byl 53,7 let (rozsah 15-86 let). Téměř polovina pacientek (47,6 %) měla negativní rodinnou nádorovou anamnézu. Z 1120 pacientek se známým histologickým typem karcinomu ovaria vyvinulo 728 (65,0 %) pacientek serózní adenokarcinom s převládajícím HGSC tumorem. 60,0 % pacientek mělo pokročilé stádium onemocnění (stádium III-IV) v době diagnózy.

#### 4.3.1. Mutace v predispozičních genech pro karcinom prsu a ovaria

S ohledem na úzký vztah nádorové predispozice pro karcinom prsu a ovaria jsme se primárně zaměřili na alterace v genech, které jsou známými predispozičními geny pro vznik dědičné formy karcinomu prsu a ovaria (BC/OC) podle NCCN Guidelines (verze 1.2020; **obrázek 17**). Přítomnost patogenních variant jsme zaznamenali u 427/1333 (32,0 %) pacientek a 58/2278 (2,5 %) kontrol (**obrázek 17, tabulka 10**). Více než jednu patogenní variantu jsme našli u 13 pacientek, které byly vyřazeny z analýz klinicko-patologických charakteristik. Nosičky zárodečných mutací v 10 genech (*BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*,

*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *RAD51D* a *RAD51C*) měly signifikantně zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria. Zárodečné varianty v genech *BRCA1* nebo *BRCA2* dominovaly a byly přítomny u 323/1320 (24,5 %) pacientek a u 12/2278 (0,5 %) populačních kontrol. U 65/1320 (4,9 %) pacientek byly nalezeny zárodečné mutace v osmi ostatních genech signifikantně asociovaných s rizikem vzniku ovariálních tumorů v naší studii (to zahrnovalo i dvě mutace v genu *STK11*, což je známý predispoziční gen pro ovariální karcinom, který v naší studii neměl signifikantně zvýšené riziko, kvůli nízké frekvenci nosiček patogenních variant u pacientek – **obrázek 17**). U populačních kontrol jsme našli pouze 19/2278 (0,8 %) nosiček patogenních variant v dalších genech asociovaných s ovariálními tumory (**tabulka 10**).

**Obrázek 17.** Celkem jsme našli 441 patogenních variant v 18 známých/kandidátních predispozičních genech pro HBOC u 427 pacientů. Červeně označené jsou nosiči (399) patogenních variant v genech signifikantně asociovaných s OC v naší studii.



CNV analýza u 18 OC/BC genů odhalila celkem 37 velkých genomických přestaveb u 37/1333 (2,8 %) pacientek, které postihovaly sedm genů (23× *BRCA1*, 4× *BRIP1*, 4× *CHEK2*, 2× *MLH1*, 2× *STK11*, 1× *PALB2* a 1× *CDH1*). Kromě jedné duplikace v genu *MSH6* (klasifikované jako varianta nejasného významu), nebyla u populačních kontrol nalezena žádná CNV varianta.

**Tabulka 10.** Frekvence patogenních variant u pacientek karcinomem ovaria a u kontrol

| Gen  | 1320 pacientek<br>N mutací (%) | 2278 kontrol<br>N mutací (%) | OR (95% CI); <i>p</i> -hodnoty           |
|--|--------------------------------|------------------------------|--|
| <b>Zvýšené riziko ovariálního karcinomu</b>        |                                |                              |  |
| <i>BRCA1</i>                                       | 229 (17,4)                     | 5 (0,2)                      | 95,2 (40,1-295,2); $1,8 \times 10^{-97}$ |
| <i>BRCA2</i>                                       | 94 (7,1)                       | 7 (0,3)                      | 24,9 (11,6-63,6); $1,2 \times 10^{-33}$  |
| <i>RAD51D</i>                                      | 13 (1,0)                       | 2 (0,1)                      | 11,3 (2,6-103,4); $9,7 \times 10^{-5}$   |
| <i>RAD51C</i>                                      | 13 (1,0)                       | 4 (0,2)                      | 5,7 (1,7-23,8); 0,001                    |
| <i>BRIP1</i>                                       | 10 (0,8)                       | 5 (0,2)                      | 3,5 (1,1-13); 0,03                       |
| <i>MLH1</i> *                                      | 4 (0,3)                        | 1 (0,04)                     | 6,9 (0,7-370,4); 0,06                    |
| <i>MSH2</i> *                                      | 3 (0,2)                        | 0                            | 0,049                                    |
| <i>MSH6</i> *                                      | 3 (0,2)                        | 0                            | 0,049                                    |
| <i>STK11</i>                                       | 2 (0,2)                        | 0                            | 0,13                                     |
| <b>Potenciálně zvýšené riziko karcinomu ovaria</b> |                                |                              |  |
| <i>NBN</i>   | 14 (1,1)                       | 7 (0,3)                      | 3,5 (1,3-10,2); 0,006                    |
| <i>PALB2</i>                                       | 8 (0,6)                        | 9 (0,4)                      | 1,5 (0,5-4,5); 0,45                      |
| <i>ATM</i>   | 6 (0,5)                        | 8 (0,4)                      | 1,3 (0,4-4,3); 0,78                      |
| <i>BARD1</i>                                       | 3 (0,2)                        | 0                            | 0,049                                    |
| <b>Žádné zvýšené riziko karcinomu ovaria</b>       |                                |                              |  |
| <i>CHEK2</i>                                       | 11 (0,8)                       | 8 (0,4)                      | 2,4 (0,9-6,8); 0,06                      |
| <i>TP53</i>  | 1 (0,1)                        | 2 (0,1)                      | 0,9 (0-16,6); 1                          |
| <i>CDH1</i>  | 0                              | 0                            | -  |
| <i>PTEN</i>  | 0                              | 0                            | -  |
| <i>NF1</i>   | 0                              | 0                            | -  |

Skupiny genů byly rozděleny na základě NCCN Guidelines, verze 2020.1

\* Agregovaná analýza genů Lynchova syndromu: OR=22,63 (95%CI 3,4-958,5);  $p=1,95 \times 10^{-5}$

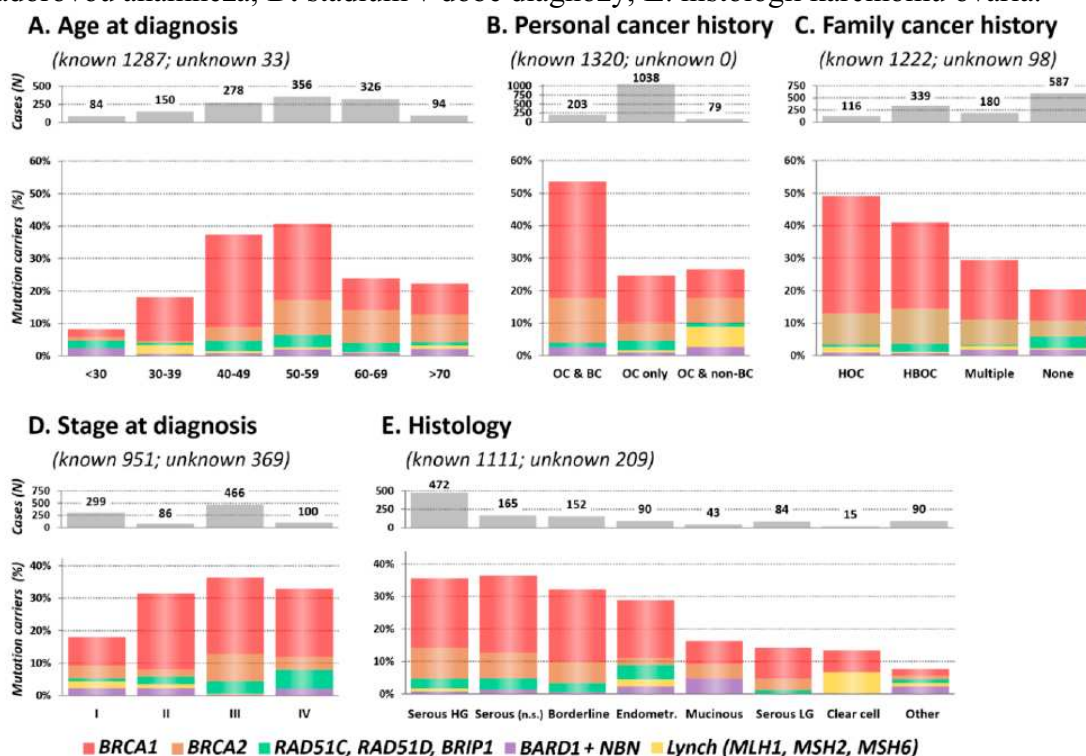
#### 4.3.2. Klinicko-patologické charakteristiky pacientek s karcinomem ovaria

Klinicko-patologické charakteristiky nosiček patogenních variant v 10 genech asociovaných s rizikem vzniku ovariálního karcinomu jsou zobrazeny na **obrázku 18**. Nosičky mnohonásobných mutací byly z této analýzy vyřazeny.

Nejvyšší frekvence mutací byla nalezena u pacientek diagnostikovaných s ovariálním karcinomem ve věkovém rozmezí 40-49 (37,4 %) a 50-59 (40,7 %) let, zatímco překvapivě nejnížší frekvence mutací byla zaznamenána u mladých žen ve věku pod 30 let (**obrázek 18A**). Frekvence mutací u nejstarší skupiny (u pacientek nad 70 let) byla dvakrát vyšší než u pacientek nejmladších (<30 let;  $p=0,013$ ). Rozdíl byl způsoben zejména mutacemi v genech *BRCA1/BRCA2*, s výrazně nižším zastoupením nosiček u mladých pacientek (3,6 % pro pacientky pod 30 let a 18,1 % pro pacientky nad 70 let), zatímco frekvence mutací v ostatních genech byla podobná (4,8 % vs. 4,3 %). Medián věku diagnózy u nosiček patogenních variant v genech *BRCA1* a *BRCA2* byl signifikantně rozdílný (51,0 let vs. 58,4 let;  $p=8,5 \times 10^{-10}$ ). Medián věku diagnózy postupně narůstal u nosiček patogenních variant v genech *RAD51C* (52,2 let), *NBN* (54,5 let), *RAD51D* (56,0 let) a *BRIP1* (58,0 let).

Nejmladší skupinou byly pacientky s patogenními variantami v genech Lynchova syndromu, kde medián činil 46,0 let. Průměrné věky patientek s PV v genech *RAD51C*, *RAD51D* a *BRIP1* nám ukazují, že je důležité i testování u genů se středním rizikem pro vznik ovariálního karcinomu (Horackova *et al.*, 2023).

**Obrázek 18.** Podíl nosičů patogenních variant v klinicko-patologických podskupinách zahrnující **A.** věk v době diagnózy, **B.** osobní nádorovou anamnézu, **C.** rodinnou nádorovou anamnézu, **D.** stádium v době diagnózy, **E.** histologii karcinomu ovaria.



Vysoký podíl mutací (109/203; 53,7 %) byl detekován u patientek s ovariálním karcinomem a karcinomem prsu, zatímco pacientky pouze s nádorovou duplicitou zahrnující ovariálním karcinomem a jakýkoliv jiný nádor kromě nádoru prsu byl nižší (obrázek 18B). Frekvence mutací u patientek z rodin s ovariálním karcinomem (HOC) byla 49,1 % (57/116, viz obrázek 18C). Klesající podíl nosičů mutací u rodin s ostatní nádorovou anamnézou (41,0 % s hereditárním karcinomem prsu či ovaria a 29,4 % u mnohonásobných nádorů) byl dominantně způsoben klesající přítomností patogenních variant v *BRCA1*. Přesto jsme u 587 patientek bez pozitivní nádorové anamnézy identifikovali 120 (20,4 %) nosiček.

Asi 60 % patientek bylo diagnostikováno se stádiem III nebo IV (6/8 nosičů variant v genech Lynchova syndromu bylo diagnostikováno se stádiem I; obrázek 18D).



Z histologického hlediska jsme rozdělili pacientky s ovariálním karcinomem na skupinu 879 pacientek s HGSC/nespecifickými serózními, border-line, a endometriodními nádory, ve které jsme našli 303/879 (34,5 %) pacientek s patogenními variantami. Druhá skupina zahrnovala 232 pacientek s LGSC, mucinózními, světlobuněčnými a ostatními nádory s 28/232 (12,1 %) nosičkami patogenních variant. *BRCA1/BRCA2* varianty u HGSC byly více než dvakrát tak častější (146/472; 30,9 %) než u LGSC (11/84; 13,1 %). Zastoupení variant u genů *RAD51C/RAD51D/BRIP1* u histologických typů bylo podobné jako u nosičů variant *BRCA1/BRCA2*. Nejnížší zastoupení variant bylo nalezeno u vzácných histologických typů (v naší studii označených jako ostatní nádory; **obrázek 18E**).

#### 4.3.3. Mutace v ostatních 201 analyzovaných genech

Na závěr jsme prozkoumali přítomnost zárodečných variant v dalších 201 genech analyzovaných panelem CZEKANCA (Soukupova *et al.*, 2018). Tato analýza odhalila 230 variant u 89 genů u 208/1333 (15,6 %) pacientek a 316/227 (13,9 %) kontrol. Z těchto pacientek jich 149 (11,2 %) mělo varianty pouze v těchto ostatních genech, zatímco 59 (4,4 %) pacientek neslo mutaci v ostatních genech spolu s variantami v jednom z deseti rizikových genů pro ovariální karcinom. Varianty v těchto ostatních genech jsou poměrně vzácné a jejich prevalence byla signifikantně vyšší u pacientek oproti kontrolám pouze u čtyř genů (**tabulka 11**).

**Tabulka 11.** Kandidátní predispoziční geny s nejvyšší četností u pacientek s nádory ovaria.

| Gen  | Pacienti N<br>Variant (%) | 2278 kontrol N<br>Variant (%) | OR (95%CI); <i>p</i> -hodnoty          |
|--|---------------------------|-------------------------------|--|
| <b>Všech 1333 pacientek s ovariálním karcinomem</b>  |                           |                               |  |
| <i>PPM1D</i>   | 16 (1,2)                  | 2 (0,1)                       | 13,8 (3,2-124,2); $7,4 \times 10^{-6}$ |
| <i>NATI</i>  | 13 (1,0)                  | 5 (0,2)                       | 4,5 (1,5-16,1); 0,003                  |
| <i>SHPRH</i>   | 5 (0,4)                   | 1 (0,04)                      | 8,6 (1,0-404,8); 0,028                 |
| <b>934 pacientek s ovariálním karcinomem bez variant v 10 rizikových genech pro ovariální karcinom</b> |                           |                               |  |
| <i>PPM1D</i>   | 12 (1,3)                  | 2 (0,1)                       | 14,8 (3,3-136,7); $1,7 \times 10^{-5}$ |
| <i>NATI</i>  | 8 (0,9)                   | 5 (0,2)                       | 4,0 (1,1-15,3); 0,026                  |
| <i>MMP8</i>  | 6 (0,6)                   | 4 (0,2)                       | 3,7 (0,9-17,7); 0,041                  |
| <i>FANCG</i>   | 5 (0,5)                   | 2 (0,1)                       | 6,1 (1,0-64,5); 0,025                  |

Pouze varianty v genu *PPM1D* byly asociovány se vznikem ovariálního karcinomu signifikantně ( $p=7,4 \times 10^{-6}$ ). Všechny varianty v genu *PPM1D* byly mozaiky s alelickou

frakcí, MAF=14-60 % u pacientů a MAF=17-19 % u kontrol. Zde je nutné podotknout, že krev, která byla použita pro genetické testování, byla odebrána po aplikaci chemoterapie (v průměru 38 měsíců po léčbě, v rozsahu 4 měsíce až 7,1 let). Celkem 7/15 pacientek s variantami v genu *PPM1D* má varianty i v genech, které se podílejí na opravách DNA (3× *BRCA2*, 1× *PALB2*, 1× *EXO1* a 1× *PMS1*). Varianty v genech *PPM1D* a *SHPRH* byly signifikantně asociovány s věkem nástupu onemocnění (>60 let;  $p=0,001$ ), stejně tak tomu bylo i u variant v genu *NAT1*. Záradečné patogenní varianty v genech *MMP8* a *FANCG* byly u pacientek s ovariálním karcinomem signifikantně nabohaceny pouze v případě, pokud se z analýzy odstranily pacientky s variantami v 10 rizikových genech pro ovariální karcinom.

V rámci této studie jsem se podílela na experimentální část, včetně izolací DNA od pacientek, přípravě sekvenačních knihoven s panelem CZEKANCA, analýze nabohacení sekvenačních knihoven pomocí qPCR a konfirmací patogenních variant pomocí Sangerova sekvenování. Dále jsem se podílela na analýze CNV variant pomocí MLPA.

## 4.4. Identifikace zárodečných variant u pacientů s hepatocelulárním karcinomem



cancers



Article

### Low Frequency of Cancer-Predisposition Gene Mutations in Liver Transplant Candidates with Hepatocellular Carcinoma

Klara Horackova <sup>1,†</sup>, Sona Frankova <sup>2,†</sup>, Petra Zemankova <sup>1,3</sup>, Petr Nehasil <sup>1,3,4</sup>, Marta Cerna <sup>1</sup>, Magdalena Neroldova <sup>5</sup>, Barbora Otahalova <sup>1,6</sup>, Jan Kral <sup>1</sup>, Milena Hovhannisyan <sup>1</sup>, Viktor Stranecky <sup>4</sup>, Tomas Zima <sup>1</sup>, Marketa Safarikova <sup>1</sup>, Marta Kalousova <sup>1</sup>, CZECA NCA Consortium <sup>1</sup>, Jan Novotny <sup>5,7</sup>, Jan Sperl <sup>2,8</sup>, Marianna Borecka <sup>1</sup>, Sandra Jelinkova <sup>1</sup>, Michal Vocka <sup>9</sup>, Marketa Janatova <sup>1</sup>, Petra Kleiblova <sup>1,7</sup>, Zdenek Kleibl <sup>1,3</sup>, Milan Jirsa <sup>1,5</sup> and Jana Soukupova <sup>1,\*,†</sup>

Dědičné formy primárních nádorů jater jsou známé, ale způsobují je velmi raritní mutace v genech souvisejících s patologickými procesy v játrech. K analýze nádorové predispozice u tohoto onkologického onemocnění nás podnítily dvě nedávné práce (Mezina *et al.*, 2021, Uson Junior *et al.*, 2022), které překvapivě identifikovaly relativně vysokou (přibližně 10 %) četnost výskytu patogenních variant v genech predisponujících k různým nádorovým onemocněním, včetně HBOC genů a genů Lynchova syndromu (viz kap. 1.2.4.3).

#### 4.4.1. Zárodečné varianty v nádorových predispozičních genech

Celkem bylo analyzováno 334 pacientů, u 47 (14,1 %) pacientů bylo nalezeno 48 patogenních variant v 35 genech (tabulka 12). Nicméně pouze u 7/334 (2,1 %) pacientů byly nalezeny patogenní varianty v genech asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu jater: *FH*, *NBN*, *PMS2* a *RET* (tabulka 12).

Nejčteněji nalezená byla varianta c.657del5 (c.657\_661delACAAA) v *NBN*, zachycená celkem u čtyř pacientů. Ostatní patogenní varianty zahrnovaly delecí 8907 bp (s delecí exonů 11 a 12) u *PMS2*, patogenní missense varianty v genech *FH* a *RET*, nicméně statisticky významný rozdíl byl nalezen pouze u patogenních variant v *NBN* ( $p=0,012$ , tabulka 12).

**Tabulka 12.** Charakterizace nosičů patogenních variant s hepatocelulárním karcinomem u prokázaných (A) a kandidátních (B) nádorových predispozičních genů. Všechny patogenní varianty byly přítomny v heterozygotním stavu.

|   | Věk<br>dg | Varianta                                       | Osobní anamnéza                          | Rodinná<br>anamnéza     | nádorová |
|---|-----------|--|--|-------------------------|----------|
| <b>Geny asociované se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu jater</b> |           |  |  |                         |          |
| Ž   | 71        | <i>PMS2</i> :Δe11-12                           | -  | negativní               |          |
| M   | 72        | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | PrC (po)                                 | PrC                     |          |
| M   | 68        | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | -  | Nádor varlat            |          |
| M   | 68        | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | PrC (po)                                 | negativní               |          |
| Ž   | 58        | <i>NBN</i> :c.657_661del5(p.Lys219AsnfsTer16)  | -  | negativní               |          |
| Ž   | 53        | <i>FH</i> :c.1127A>C(p.Gln376Pro)              | -  | negativní               |          |
| M   | 71        | <i>RET</i> :c.2304G>C (p.Glu768Asp)            | CRC (před)                               | BC, sarkom              |          |
| <b>Kandidátní nádorové predispoziční geny</b>                     |           |  |  |                         |          |
| Ž   | 69        | <i>DMBT1</i> :c.2177-2A>C                      | BC                                       | negativní               |          |
| M   | 66        | <i>DMBT1</i> :c.4828+1G>A                      | -  | HCC, leukemie           |          |
| M   | 69        | <i>DMBT1</i> :c.4611C>G(p.Tyr1537Ter)          | -  | Nádor hlavy a krku      |          |
| M   | 71        | <i>RAD50</i> :c.1875C>G(p.Tyr625Ter)           | PrC (po)                                 | BC                      |          |
| M   | 65        | <i>RAD50</i> :c.2043delC(p.Val683PhefsTer37)   | -  | negativní               |          |
| M   | 65        | <i>RAD50</i> :c.2521del9(p.Thr841GlnfsTer8)*   | -  | negativní               |          |
| M   | 65        | <i>ATRIP</i> :c.1870del2(p.Cys624ValfsTer69)   | -  | negativní               |          |
| F   | 61        | <i>ATRIP</i> :c.1152del4(p.Gly385AspfsTer2)*   | -  | negativní               |          |
| M   | 65        | <i>BLM</i> :c.1642C>T(p.Gln548Ter)             | -  | LC                      |          |
| M   | 64        | <i>BLM</i> :c.1642C>T(p.Gln548Ter)             | -  | negativní               |          |
| M   | 68        | <i>ERCC2</i> :c.2150G>C(p.Ala717Gly)           | -  | negativní               |          |
| M   | 53        | <i>ERCC2</i> :c.2150G>C(p.Ala717Gly)           | -  | negativní               |          |
| Ž   | 71        | <i>LIG3</i> :c.1283del(p.His428LeufsTer3)      | -  | negativní               |          |
| Ž   | 77        | <i>LIG3</i> :c.799C>T(p.Arg267Ter)             | -  | LC                      |          |
| M   | 68        | <i>MSH3</i> :c.2686G>T(p.Gly896Ter)            | -  | Melanom                 |          |
| M   | 66        | <i>MSH3</i> :1481del (p.Asn494ThrfsTer2)       | +  | negativní               |          |
| Ž   | 66        | <i>SLX4</i> :c.4207G>T(p.Glu1403Ter)           | Nádor kůže (po)                          | negativní               |          |
| M   | 58        | <i>SLX4</i> :c.4024del(p.Ser1342AlafsTer33)    | -  | Nádor žaludku           |          |
| Ž   | 57        | <i>AXIN1</i> :c.64C>T(p.Arg22Ter)              | -  | negativní               |          |
| M   | 62        | <i>ERCC5</i> :c.3285del10(p.Glu1095AspfsTer16) | -  | negativní               |          |
| M   | 71        | <i>ERCC6</i> :c.537T>A (p.Tyr179Ter)           | -  | negativní               |          |
| M   | 61        | <i>EXO1</i> :c.1578del2(p.Asp526GluufsTer30)   | CRC (před)                               | negativní               |          |
| Ž   | 60        | <i>FANCA</i> :Δe16-17                          | -  | negativní               |          |
| M   | 59        | <i>FANCD2</i> :c.990-1G>A                      | Leukemie (po)                            | Nádor žaludku           |          |
| Ž   | 60        | <i>FANCG</i> :c.313G>T(p.Glu105Ter)            | -  | HCC, nádor hlavy a krku |          |
| M   | 64        | <i>HOXB13</i> :c.251G>A(p.Gly84Glu)            | -  | negativní               |          |
| M   | 59        | <i>MCPH1</i> :c.1262del2(p.Lys422ArgfsTer21)   | -  | BC                      |          |
| M   | 57        | <i>MDC1</i> :c.6081del(p.Ser2028AlafsTer12)    | -  | negativní               |          |
| M   | 40        | <i>MMP8</i> :c.460G>T(p.Gly154Ter)             | -  | negativní               |          |
| M   | 61        | <i>MLH3</i> :c.3393dup2(p.Thr1132TyrfsTer)     | -  | BC                      |          |
| Ž   | 59        | <i>NHEJ1</i> :c.169C>T(p.Arg.57Ter)            | -  | HCC                     |          |
| M   | 65        | <i>PIK3CG</i> :c.2519del2(p.Asp841ThrfsTer36)  | ORL tu, nádor kůže<br>PrC (všechny před) | LC                      |          |
| M   | 54        | <i>PMS1</i> :c.1009insA(p.Tyr337LeufsTer6)     | -  | negativní               |          |
| M   | 60        | <i>RAD1</i> :c.168del5(p.Lys57fs)              | -  | negativní               |          |
| Ž   | 41        | <i>RECQL5</i> :c.2308C>T(p.Arg770Ter)          | -  | Nádor ledvin            |          |
| Ž   | 73        | <i>SBDS</i> :c.258+2T>C                        | -  | negativní               |          |
| M   | 69        | <i>SETX</i> :c.5074dup2(p.Leu1692PhefsTer8)    | -  | LC                      |          |
| M   | 59        | <i>SMARCA4</i> :c..859+1G>A                    | -  | negativní               |          |
| M   | 69        | <i>TLR2</i> :c.1339C>T(p.Arg447Ter)            | lymfom                                   | HCC                     |          |
| M   | 74        | <i>TLR4</i> :c.261-1G>C                        | -  | BC                      |          |
| Ž   | 45        | <i>XRCC1</i> :c.406dupT(p.Tyr136fs)            | -  | BC                      |          |

-\*Nosiči dvou zárodečných variant, BC – karcinom prsu, CRC – kolorektální karcinom, HCC – hepatocelulární karcinom, LC – karcinom plic, PrC – karcinom prostaty

V kandidátních predispozičních genech jsme našli patogenní varianty u 40/334 (12,0 %) pacientů (včetně jednoho pacienta s variantami v *ATRIP* a zároveň v *RAD50*) v porovnání se 104/1662 (6,3 %) populačními kontrolami (tabulka 13). Rekurentní zárodečné varianty u pacientů s hepatocelulárním karcinomem byly přítomny v osmi kandidátních genech, nicméně pouze v *DMBT1*, *RAD50* a *LIG3* vykazovaly signifikantní rozdíl od kontrol.

**Tabulka 13.** Zárodečné patogenní varianty v prokázaných (A) a kandidátních (B) nádorově predispozičních genech. Statisticky signifikantní rozdíly mezi frekvencemi variant u pacientů a kontrol jsou zvýrazněny tučným písmem

| Gen   | Nosiči u 334 pacientů; N (%) | Nosiči u 1662 kontrol; N (%) | OR (95%CI); <i>p</i> -hodnota    |
|---|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| <b>Prokázané nádorově predispoziční geny</b>  |                              |                              |                                  |
| <i>PMS2</i>                                   | 1 (0,3)                      | 4 (0,3)                      | 1,2 (0,14-11,11); 0,8            |
| <i>NBN</i>                                    | <b>4 (1,2)</b>               | <b>4 (0,3)</b>               | <b>5,0 (1,25-20,17); 0,012</b>   |
| <i>FH</i>                                     | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>RET</i>                                    | 1 (0,3)                      | 2 (0,1)                      | 2,5 (0,23-27,49); 0,4            |
| Všichni nosiči                                | 7 (2,1)                      | 10 (0,6)                     |                                  |
| <b>Kandidátní nádorově predispoziční geny</b> |                              |                              |                                  |
| <i>DMBT1</i>                                  | <b>3 (0,9)</b>               | <b>2 (0,1)</b>               | <b>7,5 (1,25-45,13); 0,010</b>   |
| <i>RAD50*</i>                                 | <b>3 (0,9)</b>               | <b>3 (0,2)</b>               | <b>5,0 (1,01-24,90); 0,029</b>   |
| <i>ATRIP*</i>                                 | 2 (0,6)                      | 3 (0,2)                      | 3,3 (0,56-19,98); 0,2            |
| <i>BLM</i>                                    | 2 (0,6)                      | 7 (0,4)                      | 1,4 (0,30-6,87); 0,7             |
| <i>ERCC2</i>                                  | 2 (0,6)                      | 8 (0,5)                      | 1,2 (0,26-5,88); 0,8             |
| <i>LIG3</i>                                   | <b>2 (0,6)</b>               | <b>1 (0,1)</b>               | <b>10,0 (0,91-110,48); 0,021</b> |
| <i>MSH3</i>                                   | 2 (0,6)                      | 6 (0,4)                      | 1,7 (0,33-8,26); 0,5             |
| <i>SLX4</i>                                   | 2 (0,6)                      | 2 (0,1)                      | 5,0 (0,70-35,56); 0,1            |
| <i>AXIN1</i>                                  | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>ERCC5</i>                                  | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>ERCC6</i>                                  | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>EXO1</i>                                   | 1 (0,3)                      | 2 (0,1)                      | 2,5 (0,23-27,49); 0,4            |
| <i>FANCA</i>                                  | 1 (0,3)                      | 7 (0,4)                      | 0,7 (0,09-5,77); 0,7             |
| <i>FANCD2</i>                                 | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>FANCG</i>                                  | 1 (0,3)                      | 2 (0,1)                      | 2,5 (0,23-27,49); 0,4            |
| <i>HOXB13</i>                                 | 1 (0,3)                      | 4 (0,3)                      | 1,2 (0,14-11,14); 0,8            |
| <i>MCPH1</i>                                  | 1 (0,3)                      | 10 (0,6)                     | 0,5 (0,06-3,88); 0,5             |
| <i>MDC1</i>                                   | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>MLH3</i>                                   | 1 (0,3)                      | 1 (0,1)                      | 5,0 (0,31-79,75); 0,2            |
| <i>MMP8</i>                                   | 1 (0,3)                      | 5 (0,3)                      | 1,0 (0,12-8,52); 0,9             |
| <i>NHEJ1</i>                                  | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>PIK3CG</i>                                 | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>PMS1</i>                                   | 1 (0,3)                      | 2 (0,1)                      | 2,5 (0,23-27,49); 0,4            |
| <i>RAD1</i>                                   | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |
| <i>RECQL5</i>                                 | 1 (0,3)                      | 6 (0,4)                      | 0,8 (0,10-6,89); 0,9             |
| <i>SBDS</i>                                   | 1 (0,3)                      | 13 (0,8)                     | 0,4 (0,05-2,91); 0,3             |
| <i>SETX</i>                                   | 1 (0,3)                      | 10 (0,6)                     | 0,5 (0,06-3,88); 0,5             |
| <i>SMARCA4</i>                                | 1 (0,3)                      | 0                            | Nedefinováno                     |

|                |           |           |                       |
|----------------|-----------|-----------|-----------------------|
| <i>TLR2</i>    | 1 (0,3)   | 1 (0,1)   | 5,0 (0,31-79,75); 0,2 |
| <i>TLR4</i>    | 1 (0,3)   | 2 (0,1)   | 2,5 (0,23-27,49); 0,4 |
| <i>XRCC1</i>   | 1 (0,3)   | 7 (0,4)   | 0,4 (0,09-5,77); 0,7  |
| Všichni nosiči | 40 (12,0) | 104 (6,3) |                       |

-\*Nosiči dvou zárodečných variant

Sedm pacientů mělo zárodečné patogenní varianty v genech, které kódují MRN (MRE11-RAD50-NBN) komplex, což zahrnovalo i čtyři pacienty s c.657del5 v *NBN* a tři pacienty s variantami v *RAD50*. Tyto varianty měly signifikantně vyšší frekvenci u pacientů s hepatocelulárním karcinomem než u kontrol (7/334; 2,1 % vs. 7/1662; 0,4 %;  $p=0,001$ ).

#### 4.4.2. Klinická charakterizace nosičů patogenních variant

Pacienti s patogenními variantami v prokázaných nádorově predispozičních genech, nebo v genech MRN komplexu se od nenosičů nelišili demografickými charakteristikami (věk, příčina cirhózy, nebo výskyt hepatocelulárního karcinomu, diabetes nebo obezita), ani charakteristikami nádorů (angioinvasze, cholangiogenní diferenciaci, recidiva po transplantaci jater). Navíc u nosičů patogenních variant nebyla zjištěna zvýšená frekvence mnohočetných nádorů (ani před, ani po transplantaci jater) nebo vyšší množství primárních malignit u příbuzných. Přežití pacientů bylo srovnatelné jak mezi nenosiči, tak mezi pacienty, kteří nesli patogenní varianty v nádorových predispozičních genech a genech MRN komplexu.

V rámci této studie jsem se podílela na prioritizaci variant, konfirmacích patogenních variant pomocí Sangerova sekvenování, analýzách CNV.

## 5. Diskuse

V rámci disertační práce jsem se podílela na analýze nádorové predispozice čtyř souborů reprezentujících pacienty s onkologickými onemocněními, které do té doby nebyly genetiky v ČR zpracovány.

### 5.1. Melanom

V rámci studie dědičné podstaty u melanomu jsme analyzovali 264 pacientů s tímto onemocněním, u kterých jsme našli devět pacientů (3,4 %) v genech asociovaných se vznikem melanomu a 22 pacientů (8,3 %), v genech predisponujících k dalším nádorovým syndromům.

Dle předpokladů, nejvíce patogenních variant jsme našli v genu *CDKN2A* (celkem šest pacientů; 2,3 %). Čtyři z šesti nosičů patogenních variant v *CDKN2A* vyvinuli více než jeden melanom (tři pacienti) nebo jiný nádor (jeden pacient). Všechna šest pacientů mělo pozitivní nádorovou anamnézu a pět z nich mělo alespoň jednoho příbuzného s melanomem. Pravděpodobnost nosičství variant v *CDKN2A* pozitivně koreluje s počtem postižených příbuzných v rodině. V analýze Goldstein *et al.* dosahovala frekvence patogenních variant *CDKN2A* 40 % u pacientů s alespoň třemi příbuznými s diagnostikovaným melanomem, ale 90 % u pacientů s více než šesti příbuznými (Goldstein *et al.*, 2007). V naší studii jsme pozorovali podobný trend, kdy jsme přítomnost patogenní varianty *CDKN2A* zaznamenali u 3/50 (6 %) pacientů s jedním příbuzným s melanomem v rodinné anamnéze a u 2/10 (20 %) pacientů se dvěma příbuznými s melanomem v rodinné anamnéze. Goldstein a její kolegové dále našli zvýšenou prevalenci nádoru pankreatu v rodinách s přítomnou patogenní variantou v *CDKN2A* (v naší studii byl zaznamenán jeden pacient). Zárodečné mutace ve vysoce rizikových genech predisponujících ke vzniku melanomu přinášejí zvýšené riziko i jiných nádorů (Read *et al.*, 2016). Spektrum nádorových onemocnění v rodinách od šesti nosičů patogenních variant v *CDKN2A* zahrnovalo melanom (7×), karcinom prsu (3×), karcinom kolorekta (2×) a solitérní případy karcinomu žaludku, pankreatu, plic a endometria, tumoru mozku a leukémie.

Tři pacienti (1,1 %) s patogenními variantami ve vysoce penetrantních genech pro melanom měli variantu v genech kódujících proteiny shelterinového komplexu (*POT1*

a *ACD*). Varianta v *POT1* p.Pro116Leu byla již dříve popsána u pacienta se sporadickým angiosarkomem srdce (Calvete *et al.*, 2017). V naší studii byla nosičem této varianty pacientka s mnohonásobným melanomem a karcinomem prsu, avšak u něj jsme zaznamenali souběžně delecii 5395 bp postihující exony 9 a 10 v genu *CHEK2*, která patří mezi nejčastěji se vyskytující patogenní zakladatelské germinální alterace v genu *CHEK2* v ČR (Kleiblova *et al.*, 2019). Mutace v *POT1* byly popisovány i v souvislosti s familiárními nemedulárními nádory štítné žlázy (Andreotti *et al.*, 2024, Srivastava *et al.*, 2020). Duplicita nádoru štítné žlázy s melanomem byla také nalezena u pacienta se sestřihovou variantou *POT1* c.703-1G>C. Patogenní variantu v dalším z genů shelterinového komplexu *ACD* jsme identifikovali u jednoho pacienta s negativní nádorovou rodinnou anamnézou. Nalezená varianta p.Val235GlyfsTer22 zkracuje C-konec proteinu, kde se nachází domény pro interakci s *POT1* a *TINF2*, což je důležité pro stabilizaci k shelterinovému komplexu (Obrázek 4) (Nelson *et al.*, 2018). V samotném genu kódujícím *TINF2* jsme identifikovali také truncační variantu p.Arg266Ter, která v době publikování práce byla považována spíše za variantu s nízkým rizikem pro vznik melanomu. Nedávno byla publikována práce Dánských autorů, která ukazuje, že truncační varianta *TINF2* lokalizovaná v podobné pozici (argininy 265-267) jako v našem souboru (p.Arg265Ter) se vyskytovala populačně specificky a opakovaně u 6/102 (6 %) osob s mnohočetným výskytem melanomu a segregovala s pestrým spektrem nádorových onemocnění (tumory štítné žlázy, kolorekta, plic, prsu, sarkomy, hematologické malignity) u jejich příbuzných (Jensen *et al.*, 2023). Truncační varianty v *TINF2* byly popsány v rodině s melanomem a mnohonásobným nádorem štítné žlázy (He *et al.*, 2020). Vyšší prevalence patogenních variant v *ACD*, *TERF2IP* a *POT1* byla nalezena u 12/132 (9,1 %) evropských a australských pacientů s mnohonásobným melanomem ( $\geq 3$ ), kteří neměli patogenní varianty ve vysoce rizikových genech (*CDKN2A*, *CDK4*, *TERT*, *BAP1*) (Aoude *et al.*, 2015a). V rámci naší studie nebyla nalezena u pacientů zvýšená prevalence variant v genu *BAP1*. V rámci italské studie Pastorino *et al.*, našli zvýšenou prevalenci zárodečných patogenních variant u *BAP1* a *POT1*, kde identifikovali 7/273 (2,6 %) pacientů s melanomem jako nosiče patogenní varianty v těchto genech (Pastorino *et al.*, 2020). Za zvýšenou prevalenci *BAP1* v Italské studii může ale pravděpodobně zařazení 22 pacientů, kteří měli vyvinuté Spitzové névy, které jsou typické pro pacienty s mutacemi v *BAP1* (Pastorino *et al.*, 2020). Zárodečné *BAP1* mutace byly vzácně nalezeny u českých pacientů zejména s uveální melanomem, nebo Spitzovými névy (Foretova *et al.*, 2019a).



Z analýzy hlavních predispozičních genů vyplývá, že patrně nejčastějším predispozičním genem pro vznik melanomu v naší populaci je *CDKN2A*, který je následován skupinou genů kódujících proteiny shelterinového komplexu. Překvapivě, alterace z pohledu nádorové predispozice patrně nejznámějšího genu shelterinového komplexu *BAP1* jsou u nás vzácné (v databázi CZECANCA konsorcia se vyskytují u šesti pacientů s „obvyklým“ spektrem nádorů, včetně tumorů ledvin, prsu a melanomu – jediný případ). Do budoucna bude zajímavé shromáždit více případů nosičů genů s alteracemi v genech shelterinového komplexu a podrobit je analýze se zaměřením na prognostické a prediktivní ukazatele (Guterres and Villanueva, 2020).

Analýza germinálních variant v dalších genech ukázala u pacientů s melanomem, že nejvyšší frekvence patogenních variant se vyskytuje v genu *NBN* (7/264 pacientů; 2,7 %). U pěti pacientů jsme našli rekurentní slovanskou zárodečnou variantu c.657del5, která tvoří i nejčastější variantu u nás (Otahalova *et al.*, 2023). Ačkoliv varianta způsobuje vznik aberantně zkráceného proteinového produktu, zbývající C-koncová část *NBN* je syntetizována z alternativního místa startu a c.657del5 se tak považuje za hypomorfni variantu, která je částečně schopna kompenzovat úlohu wildtype formy proteinu v MRN komplexu. Analýza rozsáhlého souboru více než 34 tisíc pacientů s různými nádorovými onemocněními ukázala, že podobný charakter hypomorfni variant budou mít i další germinální trunkační varianty *NBN*, které u nosičů mírně, ale signifikantně, zvyšují riziko vzniku různých nádorových onemocnění (Belhadj *et al.*, 2023). V našem souboru vyvinuly dvě pacientky spolu s melanomem ještě ovariální karcinom (zárodečné varianty v *NBN* v naší populaci byly popsány i v rámci naší ovariální studie, viz kapitola 4.3) (Lhotova *et al.*, 2020). Zvýšená prevalence melanomu u nosičů patogenní varianty *NBN* c.657del5, byla nalezena také u pacientů z Polska (frekvence srovnatelná s naší studií) a pacientů z jižního Německa (nižší frekvence oproti naší studii) (Debniak *et al.*, 2003, Meyer *et al.*, 2007). Varianty v *NBN* a v genu *BRCA2* se podílely na signifikantním zvýšení rizika a jejich prevalence byla až 9× vyšší u pacientů než u kontrol. Četnosti patogenních variant v *BRCA1* a *CHEK2* byly u pacientů oproti kontrolám statisticky hraničně nesignifikantní ( $p=0,051$ ). Role zárodečných variant u *BRCA1* a *BRCA2* v riziku rozvoje familiárního melanomu je stále předmětem diskuze (Adams *et al.*, 2020) a přesné zvýšení rizika vzniku melanomu u nosičů patogenních variant v těchto genech není jisté. Totéž můžeme říct i o *CHEK2*, kde ke stejnému výsledku došli i v nedávné studii, kdy hodnotili asociaci zárodečných *CHEK2* variant u pacientů s melanomem (Bui *et al.*, 2021).

Analýza klinicko-patologických charakteristik pacientů s melanomem ukázala, že pacienti s mnohočetným výskytem melanomu, ale i přítomnost melanomu s jiným nádorem u probanda znamenala zvýšené riziko přítomnosti patogenních variant v nádorových predispozičních genech.

## 5.2. Karcinom endometria

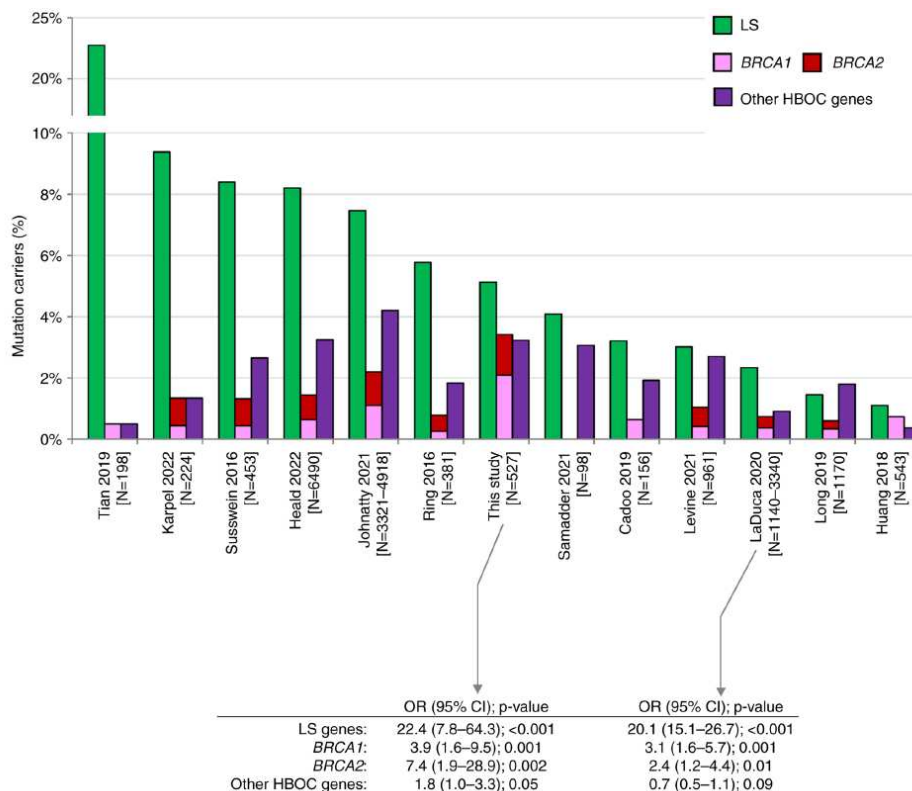
Ve studii týkající se pacientek s endometriálním karcinomem jsme analyzovali 527 pacientek a u 60 (11,4 %) pacientek jsme identifikovali patogenní varianty genech asociovaných se vznikem nádorů endometria. V současné době je genetické riziko vzniku karcinomu endometria spjata zejména se zárodečnými variantami v genech pro Lynchův syndrom, které v naší studii představovaly 5,1 % ze všech vyšetřených pacientek.

Frekvence patogenních variant v predispozičních genech identifikovaných v naší a v dalších studiích vykazovala široké rozpětí (1,1 %-22,7 %; **obrázek 19**) způsobené pravděpodobně odlišnými kritérii pro výběr pacientek napříč studiemi. Studie, kde se nacházejí nižší procenta nosiček patogenních variant v LS genech vyšetřovaly pacientky z neselektované populace, zatímco studie s nejvyššími frekvencemi nosiček patogenních variant v LS genech vybíraly pacientky s vysokým rizikem karcinomu endometria, u nichž byla přítomna pozitivní rodinná anamnéza pro Lynchův syndrom. Navzdory rozdílům ve frekvencích patogenních variant u pacientek s karcinomem endometria, riziko vývoje endometriálního karcinomu u nosiček patogenních variant v LS genech bylo obdobné v naší studii a ve studii LaDuca *et al.* (OR=22,4 pro LaDuca a OR=20,1 pro naši studii) (LaDuca *et al.*, 2020).

Méně, než pětina vyšetřených pacientek s karcinomem endometria splňovala indikační kritéria pro genetické testování hereditárního syndromu pro karcinom prsu a ovaria (98/527; 18,6 %), celková frekvence nosiček patogenních variant v genech *BRCA1/BRCA2* byla výrazně vyšší v naší studii oproti ostatním studiím (3,42 % vs. 0-2,2 %) (Levine *et al.*, 2021, Tian *et al.*, 2019, Cadoo *et al.*, 2019, Long *et al.*, 2019, Ring *et al.*, 2016, Samadder *et al.*, 2021, Johnatty *et al.*, 2021, Karpel *et al.*, 2022, Susswein *et al.*, 2016, Heald *et al.*, 2022, Huang *et al.*, 2018, LaDuca *et al.*, 2020). Pouze tři pacientky z 16 (18,8 %), které splňovaly indikační kritéria pro HBOC (a ne pro Lynchův syndrom), byly nosičkami zárodečných patogenních variant v *BRCA1* a *BRCA2*. Ve skupině pacientek, která splňovala indikační kritéria jak pro Lynchův syndrom, tak pro HBOC, byla frekvence patogenních

variant v *BRCA1* stejná jako frekvence patogenních variant pro geny Lynchova syndromu (5/85; 6,1 %), zatímco varianty v *BRCA2* se v této skupině nenacházely. Riziko vzniku endometriálního karcinomu bylo pro nosičky PV v *BRCA1/BRCA2* nižší než pro nosičky v genech pro Lynchův syndrom. Riziko *BRCA1* v naší studii bylo podobné tomu, které uvádí LaDuca *et al.* (OR=3,9 vs. OR=3,1), pro nosičky patogenních variant v *BRCA2* odhalila naše studie vyšší riziko než studie LaDuca *et al.* (OR=7,4 vs. OR=2,4). Naše studie tak naznačuje, že nosičky variant v genu *BRCA1* jsou spojeny se středním rizikem karcinomu endometria, zatímco riziko patogenních variant v genu *BRCA2* je vyšší. Endometriální karcinom by tedy měl být zařazen do indikačních kritérií ke genetickému testování, protože by mohl představovat další projev hereditárního syndromu karcinomu ovaria a prsu. Toto tvrzení je potvrzeno i studií Vietri *et al.*, která identifikovala nosičky patogenních variant v *BRCA1* a *BRCA2* u 9/21 (42,3 %) pacientek s dědičnou formou karcinomu endometria – všechny tyto pacientky splňovaly indikační kritéria pro HBOC (Vietri *et al.*, 2021). K definitivnímu potvrzení asociace patogenních variant v hlavních predispozičních HBOC genech s nádory endometria však bude zapotřebí vyhodnotit data z konsorciálních mezinárodních databází.

**Obrázek 19.** Srovnání výskytu patogenních variant v genech pro Lynchův syndrom a dalších predispozičních genech ve studiích pacientek s tumory endometria.



Mezi dalšími HBOC geny byl nejčastější výskyt patogenních variant v genech *CHEK2* (6/527; 1,1 %) a *ATM* (5/527; 1,0 %). U genu *CHEK2* bylo nalezeno významně zvýšené riziko vzniku karcinomu endometria u pacientek nesoucích tyto patogenní varianty (OR=3,2,  $p=0,04$ ). Varianty v genu *CHEK2* byly již dříve spojeny s predispozicí k endometriálním nádorům v naší populaci (Stolarova *et al.*, 2020b). Asociaci patogenních variant v *CHEK2* ve spojitosti s karcinomem endometria udává i práce Karpel *et al.* (Karpel *et al.*, 2022). Co se týče *ATM*, pouze dvě zahraniční studie publikovaly nález patogenních variant v souvislosti s endometriálním karcinomem (Cadoo *et al.*, 2019, Johnatty *et al.*, 2021). V porovnání s naší studií pozorovali Johnatty *et al.* stejnou prevalenci (1,0 %) nosičů, zatímco Cadoo *et al.* našli téměř dvojnásobnou četnost (1,9 %). Rizika vzniku endometriálního karcinomu spojená s PV v genu *ATM* nejsou prozatím známa.

U genů kódujících DNA polymerázy *POLD1* a *POLE* byla prokázána společná asociace s endometriálním karcinomem. V těchto genech jsme našli tři zárodečné varianty vedoucí ke vzniku zkráceného proteinového produktu (1× *POLD1*, 2× *POLE*). Riziko vzniku karcinomu endometria u nosičů těchto variant je v naší studii významně zvýšené (OR=10,44;  $p=0,01$ ). Zárodečné varianty genů *POLE* a *POLD1* (konkrétně missense varianty postihující jejich exonukleázové domény) byly již dříve popsány v asociaci s endometriálním karcinomem (Spurdle *et al.*, 2017). Somatické varianty v *POLE* byly popsány jako marker endometriálního karcinomu (Yen *et al.*, 2020, Leon-Castillo *et al.*, 2020). Pro přesné určení role trunkačních zárodečných variant v *POLE* a *POLD1* bude nutné provést analýzu zahrnující větší počet nosiček trunkačních variant v genech pro polymerázy.

Věk diagnózy u nosiček patogenních variant v genech Lynchova syndromu byl nižší než u pacientek bez těchto variant, což potvrzují nálezy z předchozích studií (Ring *et al.*, 2016, Long *et al.*, 2019, Tian *et al.*, 2019, Levine *et al.*, 2021). Ve skupině pacientek nesoucích PV v genech pro LS se věk nástupu onemocnění lišil. U nosiček PV v genech *MLH1* a *MSH2* byl průměrný věk 48 let a pro nosičky v genu *MSH6* byl 56 let. Tento výsledek koresponduje s výsledky již dříve publikovaných prací (Ryan *et al.*, 2017, Tian *et al.*, 2019). Stejně tak odpovídá výsledkům zahraniční studie i věk v době diagnózy u pacientek s PV v genech HBOC (Levine *et al.*, 2021). U dalších klinicko-patologických charakteristik nosiček patogenních variant odpovídají rozdíly tomu, do jaké skupiny byly pacientky zařazeny na základě indikačních kritérií. Nejvyšší frekvence PV u genů LS byla nalezena u pacientek s více než třemi nádory, pacientek s karcinomem kolorekta jako druhým nádorem v osobní anamnéze a u pacientek, které mají v rodinné anamnéze vícečetné

nádory nebo karcinom kolorekta. Stejně tak byla nejvyšší frekvence nosiček PV v HBOC genech u těch pacientek, které vyvinuly druhý nádor související se syndromem karcinomu prsu či ovaria a které měly výskyt těchto nádorů v rodinné anamnéze.

Frekvence nosiček PV byla u pacientek se dvěma nádory v osobní anamnéze 15,4 % (33/214). U 69 pacientek diagnostikovaných s karcinomem endometria a ovariálním karcinomem bylo osm nosiček s patogenními variantami v HBOC genech (11,6 %) a čtyři nosičky s patogenními variantami v genech Lynchova syndromu (5,8 %, byla zahrnuta i pacientka se dvěma patogenními variantami v genech *BRCA1* a *MLH1*, u které byla diagnostikována nádorová triplicita karcinomu endometria, ovaria a prsu). U 34 pacientek s karcinomem endometria a kolorekta neslo osm (23,5 %) pacientek PV v genech LS a pouze jedna pacientka PV v HBOC genu (*CHEK2*; 2,9 %). Výsledky ukazují, že přítomnost dvou nádorů v osobní anamnéze by mohla představovat silné indikační kritérium ke genetickému testování, což je v souladu s výsledky naší melanomové a ovariální studie (Lhotova *et al.*, 2020, Stolarova *et al.*, 2020a), ale i studií jiných autorů (Wieme *et al.*, 2021, Bychkovsky *et al.*, 2022).

Tak jak jsme očekávali, pocházela naprostá většina nosiček patogenních variant ze skupiny pacientek indikovaných ke genetickému testování, přičemž nalezené varianty korespondovaly s indikovaným syndromem. Celkem 43/60 (71,7 %) nosiček patogenních variant bylo indikováno ke genetickému testování, nicméně zbylých 17 (28,3 %) nosiček by za současných podmínek nebylo indikováno ke genetickému vyšetření. Přitom neindikované pacientky nesly patogenní varianty jak v genech pro Lynchův syndrom (*MLH1* a *MSH6*), tak v HBOC genech (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*). Z těchto pacientek dvě vyvinuly i sekundární nádor a sedm mělo pozitivní rodinnou nádorovou anamnézu (avšak v kombinacích, které nespĺňují současná indikační kritéria ke genetickému testování).

Mezi hlavní nedostatky naší studie patřil její retrospektivní charakter a absence histopatologických analýz, kdy z nádorové tkáně v době diagnózy nebylo provedeno imunohistochemické vyšetření, vyšetření mikrosatelitové nestability, ani vyšetření přítomnosti somatických alterací v genech pro polymerázy, které by umožnilo lepší stratifikaci pacientek ve studii (Gordhandas *et al.*, 2023). Další limitací bylo složení souboru pacientek, ve kterém více než polovinu tvořily pacientky z konsorcia CZECANCA (291/527; 55,4 %), kde se zaměřujeme zejména na analýzu nádorové predispozice u vysoce rizikových (indikovaných) onkologických pacientů, a nemůžeme tak vyloučit zkreslení

výsledků ve prospěch zvýšené prevalence nosiček patogenních variant. Z těchto důvodů jsme soubor rozdělili na základě indikačních kritérií a každou skupinu analyzovali samostatně.

Výsledky genetické analýzy pacientek s karcinomem endometria umožňují identifikovat spektrum germinálních variant v naší populaci a dovolují uvažovat o testování genetické predispozice u těchto pacientek.

### 5.3. Karcinom ovaria

Ve studii týkající se karcinomu ovaria bylo analyzováno 1333 pacientek a 2278 populačních kontrol. Z 18 predispozičních genů pro hereditární syndrom karcinomu prsu a ovaria převzatých z NCCN Guidelines, byly v 10 z nich identifikovány patogenní varianty, které signifikantně zvyšovaly riziko vzniku ovariálního karcinomu v naší populaci. Tyto varianty byly nalezeny u 399/1333 (29,9 %) pacientek s ovariálním karcinomem a 31/2278 (1,4 %) populačních kontrol. Mutace ve zbylých devíti genech byly buď extrémně vzácné (*CDH1*, *PTEN*, *STK11* a *TP53*), nebo se signifikantně nelišily od kontrol (*ATM*, *PALB2* a *CHEK2*), nebo nebyly zachyceny (*CDKN2A* a *NF1*). Patogenní varianty v *BRCA1/2*, *RAD51C/D* a genech Lynchova syndromu byly asociovány s vysokým rizikem vzniku karcinomu ovaria, zatímco patogenní varianty v *BRIP1* byly asociovány se středním rizikem vzniku ovariálního karcinomu v naší studii, což je shodné i s výsledky předchozích studií (Kuchenbaecker *et al.*, 2017, Weber-Lassalle *et al.*, 2018, Lilyquist *et al.*, 2017). Patogenní varianty v *BRCA1* a *BRCA2* byly přítomny u 84 % všech nosiček patogenních variant a byly nejčastějšími změnami nalezenými u 17,9 % (*BRCA1*) a 7,4 % (*BRCA2*) našich pacientek. Patogenní varianty ve zbylých osmi genech, vedených zejména variantami v *RAD51C/RAD51D/BRIP1* byly nalezeny u 5 % pacientek, tak jak bylo popsáno již dříve (Koczkowska *et al.*, 2018, Krivokuca *et al.*, 2019, Bonache *et al.*, 2018). Obdobně jako u pacientů s Lynchovým syndromem převládají u našich pacientek patogenní varianty v *MLH1* (Dominguez-Valentin *et al.*, 2020).

V porovnání s předchozími studii bylo u našich pacientek zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria u nosiček patogenních variant v *NBN* a *BARD1* (Lu *et al.*, 2019, Ramus *et al.*, 2015). V naší studii nebylo nalezeno žádné signifikantní zvýšení rizika vzniku

karcinomu ovaria pro nosičky patogenních variant v *ATM* a *PALB2*, což je v souladu s dřívějšími studiemi (Ramus *et al.*, 2015, Kurian *et al.*, 2019, Lu *et al.*, 2019).

Zastoupení patogenních variant v *CHEK2* u pacientek s karcinomem ovaria bylo nesignifikantní v porovnání s předchozí studií, kdy jsme identifikovali mírně zvýšené riziko vzniku ovariálního karcinomu u nosiček mutací v *CHEK2* (Kleiblova *et al.*, 2019). Patogenní varianty v *CDH1* a *PTEN* byly extrémně vzácné, zatímco varianty v genu *NF1* nebyly v naší studii nalezeny vůbec. U jedné pacientky s neepiteliálním ovariálním karcinomem byla nalezena PV v *STK11*, což je charakteristický projev Peutz-Jeghersova syndromu (Loveday *et al.*, 2011). Celkově vzato vysoká frekvence patogenních variant v predispozičních genech pro karcinom ovaria v naší studii je v souladu s výsledky z předchozích studií (Koczkowska *et al.*, 2018, Krivokuca *et al.*, 2019, Harter *et al.*, 2017), což může přispět k vysokému výskytu ovariálního karcinomu v naší populaci.

Naše studie odhalila 13 (1 %) pacientek, které byly nosičkami dvou a více patogenních variant. Podobná frekvence pacientek s MINAS (multilocus inherited neoplasia allele syndrom) byla nalezena i v přechozích studiích (Stradella *et al.*, 2019, McGuigan *et al.*, 2022). Zatím není zcela zřejmé, zda nosičky více než jedné patogenní varianty v syngenních genech (ovlivňujících stejnou genetickou predispozici) mají vyšší riziko než nosičky jednotlivých variant. Spíše se nám jeví, že v klinických obrazech dominuje aktivita genu s vyšší penetrancí, ale definitivní závěry vyžadují shromáždit reprezentativnější populaci vzácných nosičů vícenásobných variant.

Dostupné klinicko-patologické charakteristiky jsme analyzovali u 1320 pacientek s ovariálním karcinomem a jednou nalezenou patogenní variantou v ovariálních predispozičních genech. Nejvyšší prevalence nosičů patogenních variant v *BRCA1/2* byla u pacientek diagnostikovaných s karcinomem prsu a ovaria, zatímco nosičky patogenních variant v genech *RAD51C/RAD51D/BRIP1* byly diagnostikovány pouze s karcinomem ovaria. V porovnání s Castéra *et al.*, kde byly patogenní varianty v *RAD51C/RAD51D/BRIP1* dominantně nalezeny u pacientek s pozitivní rodinnou anamnézou (Castéra *et al.*, 2014), v naší populaci byly patogenní varianty v těchto genech nalezeny u 1/166 (0,9 %) pacientky s pozitivní rodinnou anamnézou a u 22/587 (3,7 %) pacientek s negativní rodinnou anamnézou. Dále jsme zaznamenali vysokou frekvenci patogenních variant predisponujících pro karcinom ovaria u starších pacientek. Prevalence pacientek starších 60 let byla 23,6 %, zatímco ve studii Harter *et al.* byla tato prevalence

18,9 %, i když četnost nosičů patogenních variant u pacientek pod 60 let byla v obou studiích srovnatelná (32,6 % pro naši studii a 33,2 % pro Harter *et al.*) (Harter *et al.*, 2017). Varianty v *BRCA1* byly dominantní zejména u pacientek pod 60 let, zatímco u pacientek nad 60 let byly nejčastější patogenní varianty v *BRCA2*. Navíc jsme odhalili 29 (13,9 %) *BRCA1/2* nosiček z 208 pacientek s karcinomem ovaria s diagnózou nad 60 let bez rodinné anamnézy, zatímco Morgan *et al.* detekovali pouze dvě varianty (4,3 %) *BRCA1/2* u 46 pacientek s karcinomem ovaria nad 60 let (Morgan *et al.*, 2019). U pacientek nad 70 let byla frekvence patogenních variant *BRCA1/2* vyšší než 18 %, zatímco v jiných studiích byla tato frekvence nižší než 10 % (Kuchenbaecker *et al.*, 2017, Plaskocinska *et al.*, 2016). Vysoká frekvence patogenních variant v *BRCA1/2* u našich pacientek starších 70 let odpovídala nízké frekvenci u pacientek pod 30 let (18,1 % versus 3,6 %;  $p=0,003$ ). Ještě zřetelněji byl tento rozdíl vidět u pacientek bez rodinné anamnézy, kde byly PV v *BRCA1/2* nalezeny u 6/45 (13,3 %) pacientek ve věku nad 70 let, ale u žádné z 52 pacientek pod 30 let. Ačkoliv v této podskupině se vyskytovaly vzácné histologické typy ovariálního karcinomu, tak 32/49 (65,3 %) známých případů vyvinulo invazivní epiteliální ovariální karcinom. Patogenní varianty v predispozičních genech pro karcinom ovaria významně převládaly u HGSC/nescifických serózních, border-line a endometroidních nádorů nad skupinou LGSC, mucinózních, světlo-buněčných nebo jiných vzácných nádorových histologických typů.

U 14,5 % pacientek s karcinomem ovaria bez nádorové rodinné anamnézy jsme našli patogenní varianty v genech *BRCA1/2*, tyto varianty by bez populačního screeningu nebyly nalezeny.

Výsledky naší analýzy přinesly detailní pohled na strukturu nádorové predispozice v naší populaci a jednoznačně podporují současná klinická doporučení (od roku 2019) pro testování germinálních variant u všech pacientek s ovariálními tumory (a primárními peritoneálními nádory) bez ohledu na histologický typ onemocnění, věk diagnózy či rodinou onkologickou anamnézu (Foretova *et al.*, 2019b).



## 5.4. Hepatocelulární karcinom

Genetické příčiny hepatocelulárního karcinomu jsou vzácné a hlavním rizikovým faktorem vzniku onemocnění jsou jednoznačně chronické zánětlivé procesy způsobující přestavbu jaterního parenchymu (Dragani, 2010).

Ve studii týkající se hepatocelulárního karcinomu jsme analyzovali 334 pacientů s tímto onemocněním, kteří byli většinou indikováni k transplantaci jater. Patogenní či pravděpodobně patogenní varianty ve známých nádorově predispozičních genech souvisejících se vznikem primárního karcinomu jater byly nalezeny pouze u 7/334 (2,1 %) pacientů. Za varianty s vysokou penetrancí mohou být považovány pouze alterace v genu *FH*, které byly dříve popsány u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (Mezina *et al.*, 2021). Překvapivě, nejčastěji byly zastoupeny varianty v genu *NBN* (viz [tabulka 13](#)), reprezentované čtyřmi nosiči rekurentní slovanské varianty c.657del5 (Varon *et al.*, 2000), která mírně zvyšuje riziko některých nádorových onemocnění v naší populaci (viz kapitola 4.3) (Wieme *et al.*, 2021). Nedávná práce rozsáhlého souboru pacientů z USA naznačuje, že dědičné mutace v *NBN* se podílejí na zvýšení predispozice ke vzniku pestrého spektra nádorových onemocnění bez jasnější predikce k některému z nich (Belhadj *et al.*, 2023). Gen *NBN* kóduje protein, který stabilizuje MRN komplex regulující opravu dvouřetězcových zlomů DNA. Kromě čtyř pacientů s variantami v *NBN* jsme identifikovali další tři pacienty s hepatocelulárním karcinomem, kteří nesli patogenní varianty v genu *RAD50*, jehož proteinový produkt je součástí MRN komplexu (Otahalova *et al.*, 2023). Frekvence patogenních variant v genech kódující proteiny MRN komplexu u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (2,1 %) se signifikantně lišila od frekvence u kontrol (0,4 %;  $p=0,001$ ). Zatímco patogenní varianty v genech *NBN* a *RAD50* byly pozorovány i v předchozích studiích (Mezina *et al.*, 2021, Uson Junior *et al.*, 2022), germinální patogenní varianty ve třetím genu MRN komplexu – *MRE11* jsme nenašli žádné, avšak jejich výskyt je vzácný (Hu *et al.*, 2021). Zárůdečné varianty v *NBN* byli již dříve spojovány s cirhotickými pacienty s hepatocelulárním karcinomem či s chronickou hepatitidou typu B (Rybicka *et al.*, 2020, Zhen *et al.*, 2018). U zvířecích modelů byla u hemizygotních myši pro gen *Nbn* sledována zvýšená formace nádorů jater. Tato zjištění naznačují možná zapojení komplexu MRN do vývoje hepatocelulárního karcinomu, nicméně funkční spojení s patogenezí hepatocelulárního karcinomu je nejasné.

Celková frekvence patogenních variant v naší studii (14,1 %) korespondovala s výsledky publikovanými ve studiích Mezina *et al.* (Mezina *et al.*, 2021), kteří identifikovali 25/117 (11,5 %) nosičů v prospektivní a 30/219 (13,7 %) nosičů v retrospektivní studii pacientů s hepatocelulárním karcinomem. V jiné studii Uson Junior *et al.* (Uson Junior *et al.*, 2022) našli sedm (15,9 %) patogenních variant u 44 pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Nicméně, příčinný podíl identifikovaných germinálních variant na vznik karcinomu endometria v naší analýze je velmi diskutabilní. Na rozdíl od naší studie Mezina *et al.* v retrospektivní studii identifikovali devět pacientů se zárodečnými variantami v genech *BRCA1/BRCA2* (které se v naší studii nevyskytovaly) a čtyři pacienty s patogenními alteracemi v genech Lynchova syndromu. Relativně vysoké frekvence u nosičů patogenních variant (2,1-11,4 %) ve vysoce až středně penetrantních genech pro nádorová onemocnění uvedená ve studiích Mezina *et al.* a Uson Junior *et al.* odrážejí různá vstupní kritéria a různé charakteristiky pacientů s hepatocelulárním karcinomem. V retrospektivní studii Mezina *et al.* byla vyšší frekvence nosičů PV u genů s vyšším rizikem vývoje nádorů (*APC*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, geny Lynchova syndromu), zatímco prospektivní studie byla charakterizována nízkou frekvencí patogenních variant u těchto genů (Mezina *et al.*, 2021). Při porovnání dat z naší studie a studie provedenou Mezina *et al.* jsme sledovali vysokou frekvenci u pacientů s hepatocelulárním karcinomem a druhým nádorem (17,1 % vs. 38,4 % v prospektivní studii) a vysokou frekvencí pacientů s pozitivní nádorovou anamnézou (39,2 % vs. 80 %, v prospektivní i v retrospektivní studii). V retrospektivní studii Mezina *et al.* zahrnuli autoři neobvykle vysoký podíl pacientek indikovaných ke genetickému testování (s tumorem jater jako sekundárním onemocněním) a je tedy možné, že mutace v hlavních predispozičních genech byly zachyceny jako nezávislý faktor, se vznikem karcinomu jater přímo nesouvisející. Pro porovnání jsme hledali pacienty s hepatocelulárním karcinomem z české databáze konsorcia CZEKANCA, obsahující indikované pacienty ke genetickému testování (Soukupova *et al.*, 2016). Ze souboru 10 480 pacientů jsme našli 20 vyšetřených pacientů s touto diagnózou, ze kterých dva byli nosiči patogenních variant v nádorově predispozičních genech (*BRCA1* a *CHEK2*). Tento výsledek naznačuje, že výsledky z retrospektivní studie (Mezina *et al.*, 2021) zahrnují pravděpodobné náhodné záchyty a stěžejí mohou být považovány za genetickou příčinu hepatocelulárního karcinomu. Pokud je nám známo, zvýšené riziko rozvoje hepatocelulárního karcinomu nebylo zaznamenáno (ani zdokumentováno) u nosičů patogenních variant v žádném z nádorových predispozičních genů zmíněných v naší studii.

Mezina *et al.* také identifikovali zárodečné varianty ve *FANCA* a *BRIP1* jako možné predispoziční alterace pro vznik hepatocelulárního karcinomu, avšak zatímco frekvence variant ve *FANCA* byla v naší analýze srovnatelná s frekvencí v populačních kontrolách a přítomnost patogenních variant v *BRIP1* jsme nezachytili. Navíc v naší studii jsme našli vzácné zárodečné varianty v genu *PMS1* (Li *et al.*, 2020) a u ostatních genů účastníků se reakcí na poškození DNA (DNA damage response – DDR) jako *ERCC2* a *XRCC1*, které jsou asociované se zvýšeným rizikem jaterní cirhózy a progresí hepatitidy typu B do hepatocelulárního karcinomu (Rybicka *et al.*, 2020, Zhen *et al.*, 2018). Nepodařilo se nám identifikovat patogenní varianty v jiných nádorově predispozičních genech (zahrnující *BAP1*, *DICER1*, *HNF1A*, *MET*, *TERT* a *VHL*) asociovaných s hepatocelulárním karcinomem v jiných studiích (Caruso *et al.*, 2017, Chau *et al.*, 2019, Fu *et al.*, 2020, Tovar and Graveel, 2017, Kuhlman *et al.*, 2021).

Co se týče klinicko-patologických charakteristik, pouze 5/334 pacientů v naší studii vyvinulo hepatocelulární karcinom ve tkáni bez cirhotického poškození jaterního parenchymu, což koresponduje s očekávaným vývojem onemocnění. Žádný z pacientů bez cirhózy nenesl patogenní varianty v analyzovaných genech. Vzhledem k celkově nízké frekvenci nosičů variant jsme nezaznamenali významné rozdíly v klinicko-patologických nebo nádorových charakteristikách nosičů ve srovnání s nenesli. Analýza zárodečných variant byla limitovaná 226 geny obsaženými v panelu CZEKANCA, který obsahoval nádorově predispoziční geny, ale nepokrýval některé predispoziční geny pro cirhózu jater (například *APOB*, *PNPLA3*) (Pelusi *et al.*, 2019, Singal *et al.*, 2014).

Naše výsledky tak naplňují předpoklady o malém podílu dědičných variant v nádorových predispozičních genech na vzniku hepatocelulárního karcinomu, který tak není určující diagnózou pro genetické testování. Otevřenou otázkou zůstává genetické testování u kandidátů transplantace, neboť vznik sekundárních tumorů patří mezi nejčastější příčinu úmrtí u pacientů po transplantaci a riziko vzniku nádorů u imunosuprimovaných nosičů patogenních variant v nádorových predispozičních genech by mohlo být obzvláště vysoké.

## 6. Závěr

Předkládaná disertační práce shrnuje analýzu zárodečných variant v predispozičních genech pro melanom, karcinom endometria, ovaria a hepatocelulární karcinom u pacientů v naší populaci, které do té doby nebyly systematicky studovány.

Naše analýza genů predisponujících pro vznik melanomu prokázala, že geny s vysokým až středním rizikem, včetně genů kódujících proteiny shelterinového komplexu, by měly být zahrnuty do panelové NGS analýzy nádorových vyšetření. Výsledky ukázaly, že výběr pacientů vhodných pro tuto analýzu by neměl být omezen pouze na pacienty s více primárními melanomy nebo pacienty s pozitivní rodinnou anamnézou melanomu, ale měl by zahrnovat také pacienty s melanomem a jiným primárním nádorem a melanomové pacienty s pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou.

Výsledky studie u pacientek s endometriálním karcinomem, které splňovaly indikační kritéria pro Lynchův syndrom, měly pětinásobně vyšší pravděpodobnost, že ponese patogenní variantu v genech asociovaných s dědičnou predispozicí k nádorům ve srovnání s pacientkami, které tato kritéria nesplňovaly. Přítomnost patogenních variant v genech Lynchova syndromu zvyšuje riziko vzniku endometriálního karcinomu až 20× oproti jedincům bez těchto variant. Přesto by 28,3 % nosiček patogenních variant v klinicky relevantních genech nebylo nikdy, dle současných kritérií, indikováno pro genetické testování. Z tohoto důvodu navrhuje zvážit zařazení endometriálního karcinomu jako druhého primárního nádoru u pacienta, nebo jeho výskyt v rodinné anamnéze jako kritérium pro genetické testování.

Analýza pacientek s karcinomem ovaria ukázala, že téměř jedna třetina pacientek nese jasnou patogenní variantu v genu signifikantně asociovaným se vznikem ovariálního karcinomu, čímž potvrzuje oprávněnost genetického testování neselektované populace všech pacientek s ovariálními tumory bez ohledu na věk a histologický typ onemocnění. Překvapivě patogenní varianty v *BRCA1/2* nebyly spojeny se sporadickou formou OC u velmi mladých žen (pod 30 let). Kromě již známých genů predisponujících ke vzniku karcinomu ovaria, byly geny *NBN* a *BARD1* signifikantně spojeny se středním rizikem vzniku ovariálního karcinomu. Další studie jsou však nezbytné k určení konkrétního rizika a hodnoty detekovaných patogenních variant pro prognózu a predikci terapie. Dále je nutné

zkoumat patogenní varianty v genech, které neovlivnily riziko vzniku ovariálního karcinomu, na větším množství pacientů v rámci mezinárodních konsorcií.

V rámci studia hepatocelulárního karcinomu jsme došli k závěru, že nízká celková prevalence nosičů patogenních variant způsobuje, že testování zárodečných variant u pacientů s hepatocelulárním pacientem je spíše zbytečné, pokud daný pacient nesplňuje jiná kritéria pro genetické testování (přítomnost druhých nádorů či pozitivní rodinná nádorová anamnéza). Je potřeba také zvážit možné genetické testování příjemců transplantovaných jater, aby se snížila úmrtnost na zhoubné *de novo* nádory.

Výsledky této disertační práce zmapovaly nádorovou predispozici ke vzniku studovaných onemocnění u nás. A umožnily identifikaci fenotypových charakteristik vysoce rizikových pacientů, které mohou zlepšit záchyt nosičů patogenních variant, což může přispět k lepší diagnostice či prevenci těchto nádorů v České republice.

## 7. Seznam použitých zkratek

|               |   |
|---------------|---|
| <i>ACD</i>    | ACD shelterin complex subunit and telomerase recruitment factor |
| <i>AFP</i>    | alfa-fetoprotein  |
| <i>ATM</i>    | Ataxia Telangiectasia Mutated                                   |
| <i>BAP1</i>   | <i>BRCA1</i> associated protein 1                               |
| <i>BC</i>     | karcinom prsu   |
| <i>BCLC</i>   | Barcelona Clinic Liver Cancer                                   |
| <i>BER</i>    | base excision repair  |
| <i>BMI</i>    | body-mass index   |
| <i>BRCA1</i>  | breast cancer 1   |
| <i>BRCA2</i>  | breast cancer 2   |
| <i>BRIP1</i>  | BRCA1 interacting helicase 1                                    |
| <i>cAMP</i>   | cyklický adenosinmonofosfát                                     |
| <i>CDKN2A</i> | cyclin-dependent kinase inhibitor 2A                            |
| <i>CDK4</i>   | cyclin-dependent kinase 4                                       |
| <i>CI</i>     | konfidenční interval  |
| <i>CNH</i>    | copy number high  |
| <i>CNL</i>    | copy number low   |
| <i>CNV</i>    | copy number variation   |
| <i>DNA</i>    | deoxyribonukleová kyselina                                      |
| <i>EC</i>     | endometriální karcinom  |
| <i>FIGO</i>   | Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique       |
| <i>GATK</i>   | Genome Analysis Toolkit   |
| <i>GS</i>     | Gleason skóre   |
| <i>GTP</i>    | guanosintrisfosfát  |
| <i>HBOC</i>   | syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií                   |
| <i>HBV</i>    | hepatitida typu B   |
| <i>HCC</i>    | hepatocelulární karcinom  |
| <i>HCV</i>    | hepatitida typu C   |
| <i>HGSC</i>   | high-grade serózní karcinom                                     |
| <i>IGV</i>    | Integrative Genomics Viewer                                     |
| <i>IVF</i>    | <i>in vitro</i> fertilizace                                     |
| <i>LGSC</i>   | low-grade serózní karcinom                                      |
| <i>LS</i>     | Lynchův syndrom   |
| <i>MAF</i>    | minor allele frequency  |
| <i>MC1R</i>   | melanocortin 1 receptor   |
| <i>MITF</i>   | melanocyt inducing transcription factor                         |
| <i>MLPA</i>   | multiplex ligation-dependent probe amplification                |
| <i>MMR</i>    | mismatch repair   |
| <i>MSI</i>    | mikrosatelitová nestabilita                                     |
| <i>MUTYH</i>  | MutY DNA glycosylase  |
| <i>NASH</i>   | nealkoholická steatóza jater                                    |
| <i>NBN</i>    | nibrin  |
| <i>NCCN</i>   | National Comprehensive Cancer Network                           |
| <i>NCMG</i>   | Národní centrum pro lékařskou genomiku                          |

|                |   |
|----------------|---|
| NER            | nucleotide excision repair                                |
| NGS            | sekvenování nové generace                                 |
| OC             | ovariální karcinom  |
| <i>OCA2</i>    | OCA2 melanosomal transmembrane protein                    |
| OR             | riziko  |
| <i>PALB2</i>   | partner and localizer of BRCA2                            |
| P/LP           | patogenní/pravděpodobně patogenní varianty                |
| PCR            | polymerázová řetězová reakce                              |
| PMC            | populační kontroly  |
| <i>POT1</i>    | protection of telomeres 1                                 |
| <i>PTEN</i>    | phosphatase and tensin homolog                            |
| PV             | patogenní varianty  |
| <i>RAD51C</i>  | RAD51 paralog C   |
| <i>RAD51D</i>  | RAD51 paralog D   |
| RNA            | ribonukleová kyselina                                     |
| RR             | relativní riziko  |
| <i>SLC45A2</i> | solute carrier family 45 member 2                         |
| <i>STK11</i>   | serine/threonine kinase 11                                |
| <i>TERF2</i>   | telomeric repeat-binding factor 2                         |
| <i>TERF2IP</i> | telomeric repeat-binding factor 2 - interacting protein 1 |
| <i>TINF2</i>   | TERF1 interacting nuclear factor                          |
| <i>TERT</i>    | telomerase reverse transcriptase                          |
| TNM            | tumor, node, metastases                                   |
| UTR            | untranslated region                                       |
| UV             | ultrafialové záření                                       |
| VCF            | variant-call format                                       |
| VUS            | varianta nejasného významu                                |

## 8. Seznam použité literatury

- ADAMS, D. J., BISHOP, D. T. & ROBLES-ESPINOZA, C. D. 2020. Melanoma predisposition-A limited role for germline BRCA1 and BRCA2 variants. *Pigment Cell Melanoma Res*, 33, 6-7.
- ANDREOTTI, V., VANNI, I., PASTORINO, L., GHIORZO, P. & BRUNO, W. 2024. Germline POT1 Variants: A Critical Perspective on POT1 Tumor Predisposition Syndrome. *Genes (Basel)*, 15.
- AOUDE, L. G., PRITCHARD, A. L., ROBLES-ESPINOZA, C. D., WADT, K., HARLAND, M., CHOI, J., GARTSIDE, M., QUESADA, V., JOHANSSON, P., PALMER, J. M., RAMSAY, A. J., ZHANG, X., JONES, K., SYMMONS, J., HOLLAND, E. A., SCHMID, H., BONAZZI, V., WOODS, S., DUTTON-REGESTER, K., STARK, M. S., SNOWDEN, H., VAN DOORN, R., MONTGOMERY, G. W., MARTIN, N. G., KEANE, T. M., LOPEZ-OTIN, C., GERDES, A. M., OLSSON, H., INGVAR, C., BORG, A., GRUIS, N. A., TRENT, J. M., JONSSON, G., BISHOP, D. T., MANN, G. J., NEWTON-BISHOP, J. A., BROWN, K. M., ADAMS, D. J. & HAYWARD, N. K. 2015a. Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 107.
- AOUDE, L. G., WADT, K. A., PRITCHARD, A. L. & HAYWARD, N. K. 2015b. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell Melanoma Res*, 28, 148-60.
- BADIE, S., LIAO, C., THANASOULA, M., BARBER, P., HILL, M. A. & TARSOUNAS, M. 2009. RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation. *J Cell Biol*, 185, 587-600.
- BALLESTER, R., MARCHUK, D., BOGUSKI, M., SAULINO, A., LETCHER, R., WIGLER, M. & COLLINS, F. 1990. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell*, 63, 851-9.
- BANNO, K., KISU, I., YANOKURA, M., MASUDA, K., UEKI, A., KOBAYASHI, Y., HIRASAWA, A. & AOKI, D. 2013. Hereditary gynecological tumors associated with Peutz-Jeghers syndrome (Review). *Oncol Lett*, 6, 1184-1188.
- BARROW, E., HILL, J. & EVANS, D. G. 2013. Cancer risk in Lynch Syndrome. *Fam Cancer*, 12, 229-40.
- BEGGS, A. D., LATCHFORD, A. R., VASEN, H. F., MOSLEIN, G., ALONSO, A., ARETZ, S., BERTARIO, L., BLANCO, I., BULOW, S., BURN, J., CAPELLA, G., COLAS, C., FRIEDL, W., MOLLER, P., HES, F. J., JARVINEN, H., MECKLIN, J. P., NAGENGAST, F. M., PARC, Y., PHILLIPS, R. K., HYER, W., PONZ DE LEON, M., RENKONEN-SINISALO, L., SAMPSON, J. R., STORMORKEN, A., TEJPAR, S., THOMAS, H. J., WIJNEN, J. T., CLARK, S. K. & HODGSON, S. V. 2010. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut*, 59, 975-86.
- BELHADJ, S., KHURRAM, A., BANDLAMUDI, C., PALOU-MARQUEZ, G., RAVICHANDRAN, V., STEINSNYDER, Z., WILDMAN, T., CATCHINGS, A., KEMEL, Y., MUKHERJEE, S., FESKO, B., ARORA, K., MEHINE, M., DANDIKER, S., IZHAR, A., PETRINI, J., DOMCHEK, S., NATHANSON, K. L., BROWER, J., COUCH, F., STADLER, Z., ROBSON, M., WALSH, M., VIJAI, J., BERGER, M., SUPEK, F., KARAM, R., TOPKA, S. & OFFIT, K. 2023. NBN Pathogenic Germline Variants are Associated with Pan-Cancer Susceptibility and In Vitro DNA Damage Response Defects. *Clin Cancer Res*, 29, 422-431.



- BELLIDO, F., PINEDA, M., AIZA, G., VALDES-MAS, R., NAVARRO, M., PUENTE, D. A., PONS, T., GONZALEZ, S., IGLESIAS, S., DARDER, E., PINOL, V., SOTO, J. L., VALENCIA, A., BLANCO, I., URIOSTE, M., BRUNET, J., LAZARO, C., CAPELLA, G., PUENTE, X. S. & VALLE, L. 2016. POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. *Genet Med*, 18, 325-32.
- BELTRAN, H., ENG, K., MOSQUERA, J. M., SIGARAS, A., ROMANEL, A., RENNERT, H., KOSSAI, M., PAULI, C., FALTAS, B., FONTUGNE, J., PARK, K., BANFELDER, J., PRANDI, D., MADHUKAR, N., ZHANG, T., PADILLA, J., GRECO, N., MCNARY, T. J., HERRSCHER, E., WILKES, D., MACDONALD, T. Y., XUE, H., VACIC, V., EMDE, A. K., OSCHWALD, D., TAN, A. Y., CHEN, Z., COLLINS, C., GLEAVE, M. E., WANG, Y., CHAKRAVARTY, D., SCHIFFMAN, M., KIM, R., CAMPAGNE, F., ROBINSON, B. D., NANUS, D. M., TAGAWA, S. T., XIANG, J. Z., SMOGORZEWSKA, A., DEMICHELIS, F., RICKMAN, D. S., SBONER, A., ELEMENTO, O. & RUBIN, M. A. 2015. Whole-Exome Sequencing of Metastatic Cancer and Biomarkers of Treatment Response. *JAMA Oncol*, 1, 466-74.
- BERAL, V. & ROBINSON, N. 1981. The relationship of malignant melanoma, basal and squamous skin cancers to indoor and outdoor work. *Br J Cancer*, 44, 886-91.
- BERNARDS, S. S., NORQUIST, B. M., HARRELL, M. I., AGNEW, K. J., LEE, M. K., WALSH, T. & SWISHER, E. M. 2016. Genetic characterization of early onset ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 140, 221-5.
- BERTRAM, J. S. 2000. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*, 21, 167-223.
- BONACHE, S., ESTEBAN, I., MOLES-FERNANDEZ, A., TENES, A., DURAN-LOZANO, L., MONTALBAN, G., BACH, V., CARRASCO, E., GADEA, N., LOPEZ-FERNANDEZ, A., TORRES-ESQUIUS, S., MANCUSO, F., CARATU, G., VIVANCOS, A., TUSET, N., BALMANA, J., GUTIERREZ-ENRIQUEZ, S. & DIEZ, O. 2018. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144, 2495-2513.
- BUI, A. N., LEBOEUF, N. R. & NAMBUDIRI, V. E. 2021. Skin cancer risk in CHEK2 mutation carriers. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 35, 353-359.
- BYCHKOVSKY, B. L., LO, M.-T., YUSSUF, A., HORTON, C., RICHARDSON, M., LADUCA, H., GARBER, J. E. & RANA, H. Q. 2022. Prevalence and spectrum of pathogenic variants among patients with multiple primary cancers evaluated by clinical characteristics. *Cancer*, 128, 1275-1283.
- CADDOO, K. A., MANDELKER, D. L., MUKHERJEE, S., STEWART, C., DELAIR, D., RAVICHANDRAN, V., SRINIVASAN, P., HURLEY, D., KEMEL, Y., ARNOLD, A. G., SHEEHAN, M., PRADHAN, N., JOSEPH, V., CHI, D. S., GARDNER, G. J., JEWELL, E. L., LEITAO, M. M., JR., ROCHE, K. L., MUELLER, J. J., SONODA, Y., ZIVANOVIC, O., WALSH, M., CARLO, M. I., BERGER, M. F., HYMAN, D., ZHANG, L., ROBSON, M. E., OFFIT, K., AGHAJANIAN, C., RUSTUM, N. R. A. & STADLER, Z. 2019. Understanding inherited risk in unselected newly diagnosed patients with endometrial cancer. *JCO Precis Oncol*, 3.
- CALVETE, O., GARCIA-PAVIA, P., DOMINGUEZ, F., BOUGEARD, G., KUNZE, K., BRAEUNINGER, A., TEULE, A., LASA, A., RAMON, Y. C. T., LLORT, G., FERNANDEZ, V., LAZARO, C., URIOSTE, M. & BENITEZ, J. 2017. The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *Eur J Hum Genet*, 25, 1278-1281.

- CANCER GENOME ATLAS, N. 2015. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, 161, 1681-96.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. 2011. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474, 609-15.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N., KANDOTH, C., SCHULTZ, N., CHERNIACK, A. D., AKBANI, R., LIU, Y., SHEN, H., ROBERTSON, A. G., PASHTAN, I., SHEN, R., BENZ, C. C., YAU, C., LAIRD, P. W., DING, L., ZHANG, W., MILLS, G. B., KUCHERLAPATI, R., MARDIS, E. R. & LEVINE, D. A. 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 497, 67-73.
- CANNON-ALBRIGHT, L. A., GOLDFAR, D. E., MEYER, L. J., LEWIS, C. M., ANDERSON, D. E., FOUNTAIN, J. W., HEGI, M. E., WISEMAN, R. W., PETTY, E. M., BALE, A. E. & ET AL. 1992. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science*, 258, 1148-52.
- CARBONE, M., YANG, H., PASS, H. I., KRAUSZ, T., TESTA, J. R. & GAUDINO, G. 2013. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer*, 13, 153-9.
- CARUSO, S., CALDERARO, J., LETOUZE, E., NAULT, J. C., COUCHY, G., BOULAI, A., LUCIANI, A., ZAFRANI, E. S., BIOULAC-SAGE, P., SEROR, O., IMBEAUD, S. & ZUCMAN-ROSSI, J. 2017. Germline and somatic DICER1 mutations in familial and sporadic liver tumors. *J Hepatol*, 66, 734-742.
- CASTÉRA, L., KRIEGER, S., ROUSSELIN, A., LEGROS, A., BAUMANN, J. J., BRUET, O., BRAULT, B., FOUILLET, R., GOARDON, N., LETAC, O., BAERT-DESURMONT, S., TINAT, J., BERA, O., DUGAST, C., BERTHET, P., POLYCARPE, F., LAYET, V., HARDOUIN, A., FRÉBOURG, T. & VAUR, D. 2014. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet*, 22, 1305-13.
- CONFORTI, C. & ZALAUDEK, I. 2021. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatol Pract Concept*, 11, e2021161S.
- CUMMINGS, S., ROMAN, S. S., SAAM, J., BERNHISEL, R., BROWN, K., LANCASTER, J. M. & USHA, L. 2021. Age of ovarian cancer diagnosis among BRIP1, RAD51C, and RAD51D mutation carriers identified through multi-gene panel testing. *J Ovarian Res*, 14, 61.
- CURTIN, J. A., FRIDLYAND, J., KAGESHITA, T., PATEL, H. N., BUSAM, K. J., KUTZNER, H., CHO, K. H., AIBA, S., BROCKER, E. B., LEBOIT, P. E., PINKEL, D. & BASTIAN, B. C. 2005. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*, 353, 2135-47.
- CURTIUS, K., GUPTA, S. & BOLAND, C. R. 2022. Review article: Lynch Syndrome-a mechanistic and clinical management update. *Aliment Pharmacol Ther*, 55, 960-977.
- D'AMICO, G., MORABITO, A., D'AMICO, M., PASTA, L., MALIZIA, G., REBORA, P. & VALSECCHI, M. G. 2018. Clinical states of cirrhosis and competing risks. *J Hepatol*, 68, 563-576.
- DANIEL JENSEN, J. & ELEWSKI, B. E. 2015. The ABCDEF Rule: Combining the "ABCDE Rule" and the "Ugly Duckling Sign" in an Effort to Improve Patient Self-Screening Examinations. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 8, 15-15.
- DANIELS, M. S. & LU, K. H. 2016. Genetic predisposition in gynecologic cancers. *Semin Oncol*, 43, 543-547.
- DE JONGE, M. M., DE KROON, C. D., JENNER, D. J., OOSTING, J., DE HULLU, J. A., MOURITS, M. J. E., GOMEZ GARCIA, E. B., AUSEMS, M., MARGRIET

- COLLEE, J., VAN ENGELEN, K., VAN DE BEEK, I., HEBON, G., SMIT, V., ROOKUS, M. A., DE BOCK, G. H., VAN LEEUWEN, F. E., BOSSE, T., DEKKERS, O. M. & VAN ASPEREN, C. J. 2021. Endometrial Cancer Risk in Women With Germline BRCA1 or BRCA2 Mutations: Multicenter Cohort Study. *J Natl Cancer Inst*, 113, 1203-1211.
- DEBNIAK, T., GÓRSKI, B., CYBULSKI, C., JAKUBOWSKA, A., KURZAWSKI, G., LENER, M., MIERZEJEWSKI, M., MASOJĆ, B., MEDREK, K., KŁADNY, J., ZAŁUGA, E., MALESZKA, R., CHOSIA, M. & LUBIŃSKI, J. 2003. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in patients with malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res*, 13, 365-70.
- DOMINGUEZ-VALENTIN, M., NAKKEN, S., TUBEUF, H., VODAK, D., EKSTROM, P. O., NISSEN, A. M., MORAK, M., HOLINSKI-FEDER, E., MARTINS, A., MOLLER, P. & HOVIG, E. 2018. Potentially pathogenic germline CHEK2 c.319+2T>A among multiple early-onset cancer families. *Fam Cancer*, 17, 141-153.
- DOMINGUEZ-VALENTIN, M., SAMPSON, J. R., SEPPALA, T. T., TEN BROEKE, S. W., PLAZZER, J. P., NAKKEN, S., ENGEL, C., ARETZ, S., JENKINS, M. A., SUNDE, L., BERNSTEIN, I., CAPELLA, G., BALAGUER, F., THOMAS, H., EVANS, D. G., BURN, J., GREENBLATT, M., HOVIG, E., DE VOS TOT NEDERVEEN CAPPEL, W. H., SIJMONS, R. H., BERTARIO, L., TIBILETTI, M. G., CAVESTRO, G. M., LINDBLOM, A., DELLA VALLE, A., LOPEZ-KOSTNER, F., GLUCK, N., KATZ, L. H., HEINIMANN, K., VACCARO, C. A., BUTTNER, R., GORGENS, H., HOLINSKI-FEDER, E., MORAK, M., HOLZAPFEL, S., HUNEBURG, R., KNEBEL DOEBERITZ, M. V., LOEFFLER, M., RAHNER, N., SCHACKERT, H. K., STEINKE-LANGE, V., SCHMIEGEL, W., VANGALA, D., PYLVANAINEN, K., RENKONEN-SINISALO, L., HOPPER, J. L., WIN, A. K., HAILE, R. W., LINDOR, N. M., GALLINGER, S., LE MARCHAND, L., NEWCOMB, P. A., FIGUEIREDO, J. C., THIBODEAU, S. N., WADT, K., THERKILDSEN, C., OKKELS, H., KETABI, Z., MOREIRA, L., SANCHEZ, A., SERRA-BURRIEL, M., PINEDA, M., NAVARRO, M., BLANCO, I., GREEN, K., LALLOO, F., CROSBIE, E. J., HILL, J., DENTON, O. G., FRAYLING, I. M., RODLAND, E. A., VASEN, H., MINTS, M., NEFFA, F., ESPERON, P., ALVAREZ, K., KARIV, R., ROSNER, G., PINERO, T. A., GONZALEZ, M. L., KALFAYAN, P., TJANDRA, D., WINSHIP, I. M., MACRAE, F., MOSLEIN, G., MECKLIN, J. P., NIELSEN, M. & MOLLER, P. 2020. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Genet Med*, 22, 15-25.
- DRAGANI, T. A. 2010. Risk of HCC: genetic heterogeneity and complex genetics. *J Hepatol*, 52, 252-7.
- FORETOVA, L., NAVRATILOVA, M., SVOBODA, M., HAZOVA, J., VASICKOVA, P., STAHOVA, E. H., FABIAN, P., SCHNEIDEROVA, M. & MACHACKOVA, E. 2019a. BAP1 Syndrome - Predisposition to Malignant Mesothelioma, Skin and Uveal Melanoma, Renal and Other Cancers. *Klin Onkol*, 32, 118-122.
- FORETOVA, L., NAVRATILOVA, M., SVOBODA, M., VASICKOVA, P., STAHOVA, E. H., HAZOVA, J., KLEIBLOVA, P., KLEIBL, Z., MACHACKOVA, E., PALACOVA, M. & PETRAKOVA, K. 2019b. Recommendations for Preventive Care for Women with Rare Genetic Cause of Breast and Ovarian Cancer. *Klin Onkol*, 32, 6-13.
- FOULKES, W. D. 2008. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med*, 359, 2143-53.

- FU, J., WANG, T., ZHAI, X. & XIAO, X. 2020. Primary hepatocellular adenoma due to biallelic HNF1A mutations and its co-occurrence with MODY 3: case-report and review of the literature. *Endocrine*, 67, 544-551.
- FU, Z., BROOKS, M. M., IRVIN, S., JORDAN, S., ABEN, K. K. H., ANTON-CULVER, H., BANDERA, E. V., BECKMANN, M. W., BERCHUCK, A., BROOKS-WILSON, A., CHANG-CLAUDE, J., COOK, L. S., CRAMER, D. W., CUSHING-HAUGEN, K. L., DOHERTY, J. A., EKICI, A. B., FASCHING, P. A., FORTNER, R. T., GAYTHER, S. A., GENTRY-MAHARAJ, A., GILES, G. G., GOODE, E. L., GOODMAN, M. T., HARRIS, H. R., HEIN, A., KAAKS, R., KIEMENEY, L. A., KOBEL, M., KOTSOPOULOS, J., LE, N. D., LEE, A. W., MATSUO, K., MCGUIRE, V., MCLAUGHLIN, J. R., MENON, U., MILNE, R. L., MOYSICH, K. B., PEARCE, C. L., PIKE, M. C., QIN, B., RAMUS, S. J., RIGGAN, M. J., ROTHSTEIN, J. H., SCHILDKRAUT, J. M., SIEH, W., SUTPHEN, R., TERRY, K. L., THOMPSON, P. J., TITUS, L., VAN ALTENA, A. M., WHITE, E., WHITTEMORE, A. S., WU, A. H., ZHENG, W., ZIOGAS, A., TAYLOR, S. E., TANG, L., SONGER, T., WENTZENSEN, N., WEBB, P. M., GROUP, A., RISCH, H. A. & MODUGNO, F. 2023. Lifetime ovulatory years and risk of epithelial ovarian cancer: a multinational pooled analysis. *J Natl Cancer Inst*, 115, 539-551.
- GAUDY-MARQUESTE, C., WAZAEFI, Y., BRUNEU, Y., TRILLER, R., THOMAS, L., PELLACANI, G., MALVEHY, J., AVRIL, M. F., MONESTIER, S., RICHARD, M. A., FERTIL, B. & GROB, J. J. 2017. Ugly Duckling Sign as a Major Factor of Efficiency in Melanoma Detection. *JAMA Dermatol*, 153, 279-284.
- GIARDIELLO, F. M., BRENSINGER, J. D., TERSMETTE, A. C., GOODMAN, S. N., PETERSEN, G. M., BOOKER, S. V., CRUZ-CORREA, M. & OFFERHAUS, J. A. 2000. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*, 119, 1447-53.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE LIVER CANCER, C., AKINYEMIJU, T., ABERA, S., AHMED, M., ALAM, N., ALEMAYOHU, M. A., ALLEN, C., AL-RADDADI, R., ALVIS-GUZMAN, N., AMOAKO, Y., ARTAMAN, A., AYELE, T. A., BARAC, A., BENSENOR, I., BERHANE, A., BHUTTA, Z., CASTILLO-RIVAS, J., CHITHEER, A., CHOI, J. Y., COWIE, B., DANDONA, L., DANDONA, R., DEY, S., DICKER, D., PHUC, H., EKWUEME, D. U., ZAKI, M. S., FISCHER, F., FURST, T., HANCOCK, J., HAY, S. I., HOTEZ, P., JEE, S. H., KASAEIAN, A., KHADER, Y., KHANG, Y. H., KUMAR, A., KUTZ, M., LARSON, H., LOPEZ, A., LUNEVICIUS, R., MALEKZADEH, R., MCALINDEN, C., MEIER, T., MENDOZA, W., MOKDAD, A., MORADI-LAKEH, M., NAGEL, G., NGUYEN, Q., NGUYEN, G., OGBO, F., PATTON, G., PEREIRA, D. M., POURMALEK, F., QORBANI, M., RADFAR, A., ROSHANDEL, G., SALOMON, J. A., SANABRIA, J., SARTORIUS, B., SATPATHY, M., SAWHNEY, M., SEPANLOU, S., SHACKELFORD, K., SHORE, H., SUN, J., MENGISTU, D. T., TOPOR-MADRY, R., TRAN, B., UKWAJA, K. N., VLASSOV, V., VOLLSET, S. E., VOS, T., WAKAYO, T., WEIDERPASS, E., WERDECKER, A., YONEMOTO, N., YOUNIS, M., YU, C., ZAIDI, Z., ZHU, L., MURRAY, C. J. L., NAGHAVI, M. & FITZMAURICE, C. 2017. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol*, 3, 1683-1691.
- GOLDSTEIN, A. M., CHAN, M., HARLAND, M., HAYWARD, N. K., DEMENAIS, F., BISHOP, D. T., AZIZI, E., BERGMAN, W., BIANCHI-SCARRA, G., BRUNO, W., CALISTA, D., ALBRIGHT, L. A., CHAUDRU, V., CHOMPRET, A., CUELLAR, F., ELDER, D. E., GHIORZO, P., GILLANDERS, E. M., GRUIS, N.

- A., HANSSON, J., HOGG, D., HOLLAND, E. A., KANETSKY, P. A., KEFFORD, R. F., LANDI, M. T., LANG, J., LEACHMAN, S. A., MACKIE, R. M., MAGNUSSON, V., MANN, G. J., BISHOP, J. N., PALMER, J. M., PUIG, S., PUIG-BUTILLE, J. A., STARK, M., TSAO, H., TUCKER, M. A., WHITAKER, L., YAKOBSON, E., LUND MELANOMA STUDY, G. & MELANOMA GENETICS, C. 2007. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet*, 44, 99-106.
- GOLDSTEIN, A. M., XIAO, Y., SAMPSON, J., ZHU, B., ROTUNNO, M., BENNETT, H., WEN, Y., JONES, K., VOGT, A., BURDETTE, L., LUO, W., ZHU, B., YEAGER, M., HICKS, B., HAN, J., DE VIVO, I., KOUTROS, S., ANDREOTTI, G., BEANE-FREEMAN, L., PURDUE, M., FREEDMAN, N. D., CHANOCK, S. J., TUCKER, M. A. & YANG, X. R. 2017. Rare germline variants in known melanoma susceptibility genes in familial melanoma. *Hum Mol Genet*, 26, 4886-4895.
- GORDHANDAS, S., RIOS-DORIA, E., CADOO, K. A., CATCHINGS, A., MAIO, A., KEMEL, Y., SHEEHAN, M., RANGANATHAN, M., GREEN, D., ARYAMVALLY, A., ARNOLD, A. G., SALO-MULLEN, E., MANNING-GEIST, B., SIA, T., SELENICA, P., DA CRUZ PAULA, A., VANDERBILT, C., MISYURA, M., LEITAO, M. M., MUELLER, J. J., MAKKER, V., RUBINSTEIN, M., FRIEDMAN, C. F., ZHOU, Q., IASONOS, A., LATHAM, A., CARLO, M. I., MURCIANO-GOROFF, Y. R., WILL, M., WALSH, M. F., ISSA BHALOO, S., ELLENSON, L. H., CEYHAN-BIRSOY, O., BERGER, M. F., ROBSON, M. E., ABU-RUSTUM, N., AGHAJANIAN, C., OFFIT, K., STADLER, Z., WEIGELT, B., MANDELKER, D. L. & LIU, Y. L. 2023. Comprehensive analysis of germline drivers in endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst*, 115, 560-569.
- GOYDOS, J. S., MANN, B., KIM, H. J., GABRIEL, E. M., ALSINA, J., GERMINO, F. J., SHIH, W. & GORSKI, D. H. 2005. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. *J Am Coll Surg*, 200, 362-70.
- GUTERRES, A. N. & VILLANUEVA, J. 2020. Targeting telomerase for cancer therapy. *Oncogene*, 39, 5811-5824.
- HANAHAH, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12, 31-46.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARTER, P., HAUKE, J., HEITZ, F., REUSS, A., KOMMOSS, S., MARMÉ, F., HEIMBACH, A., PRIESKE, K., RICHTERS, L., BURGESS, A., NEIDHARDT, G., DE GREGORIO, N., EL-BALAT, A., HILPERT, F., MEIER, W., KIMMIG, R., KAST, K., SEHOULI, J., BAUMANN, K., JACKISCH, C., PARK-SIMON, T. W., HANKER, L., KRÖBER, S., PFISTERER, J., GEVENSLEBEN, H., SCHNELZER, A., DIETRICH, D., NEUNHÖFFER, T., KROCKENBERGER, M., BRUCKER, S. Y., NÜRNBERG, P., THIELE, H., ALTMÜLLER, J., LAMLA, J., ELSER, G., DU BOIS, A., HAHNEN, E. & SCHMUTZLER, R. 2017. Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS One*, 12, e0186043.
- HAWKES, J. E., TRUONG, A. & MEYER, L. J. 2016. Genetic predisposition to melanoma. *Semin Oncol*, 43, 591-597.
- HE, H., LI, W., COMISKEY, D. F., LIYANARACHCHI, S., NIEMINEN, T. T., WANG, Y., DELAP, K. E., BROCK, P. & DE LA CHAPELLE, A. 2020. A Truncating Germline Mutation of TINF2 in Individuals with Thyroid Cancer or Melanoma Results in Longer Telomeres. *Thyroid*, 30, 204-213.

- HEALD, B., MOKHTARY, S., NIELSEN, S. M., ROJAHN, S., YANG, S., MICHALSKI, S. T. & ESPLIN, E. D. 2022. Unexpected actionable genetic variants revealed by multigene panel testing of patients with uterine cancer. *Gynecol Oncol*, 166, 344-350.
- HEARLE, N., SCHUMACHER, V., MENKO, F. H., OLSCHWANG, S., BOARDMAN, L. A., GILLE, J. J., KELLER, J. J., WESTERMAN, A. M., SCOTT, R. J., LIM, W., TRIMBATH, J. D., GIARDIELLO, F. M., GRUBER, S. B., OFFERHAUS, G. J., DE ROOIJ, F. W., WILSON, J. H., HANSMANN, A., MOSLEIN, G., ROYER-POKORA, B., VOGEL, T., PHILLIPS, R. K., SPIGELMAN, A. D. & HOULSTON, R. S. 2006. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res*, 12, 3209-15.
- HILL, V. K., GARTNER, J. J., SAMUELS, Y. & GOLDSTEIN, A. M. 2013. The genetics of melanoma: recent advances. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 14, 257-79.
- 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.
- HORN, S., FIGL, A., RACHAKONDA, P. S., FISCHER, C., SUCKER, A., GAST, A., KADEL, S., MOLL, I., NAGORE, E., HEMMINKI, K., SCHADENDORF, D. & KUMAR, R. 2013. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*, 339, 959-61.
- HU-LIESKOVAN, S., MOK, S., HOMET MORENO, B., TSOI, J., ROBERT, L., GOEDERT, L., PINHEIRO, E. M., KOYA, R. C., GRAEBER, T. G., COMIN-ANDUIX, B. & RIBAS, A. 2015. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) melanoma. *Sci Transl Med*, 7, 279ra41.
- HU, C., HART, S. N., GNANAOLIVU, R., HUANG, H., LEE, K. Y., NA, J., GAO, C., LILYQUIST, J., YADAV, S., BODDICKER, N. J., SAMARA, R., KLEBBA, J., AMBROSONE, C. B., ANTON-CULVER, H., AUER, P., BANDERA, E. V., BERNSTEIN, L., BERTRAND, K. A., BURNSIDE, E. S., CARTER, B. D., ELIASSEN, H., GAPSTUR, S. M., GAUDET, M., HAIMAN, C., HODGE, J. M., HUNTER, D. J., JACOBS, E. J., JOHN, E. M., KOOPERBERG, C., KURIAN, A. W., LE MARCHAND, L., LINDSTROEM, S., LINDSTROM, T., MA, H., NEUHAUSEN, S., NEWCOMB, P. A., O'BRIEN, K. M., OLSON, J. E., ONG, I. M., PAL, T., PALMER, J. R., PATEL, A. V., REID, S., ROSENBERG, L., SANDLER, D. P., SCOTT, C., TAMIMI, R., TAYLOR, J. A., TRENTHAM-DIETZ, A., VACHON, C. M., WEINBERG, C., YAO, S., ZIOGAS, A., WEITZEL, J. N., GOLDFAR, D. E., DOMCHEK, S. M., NATHANSON, K. L., KRAFT, P., POLLEY, E. C. & COUCH, F. J. 2021. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N Engl J Med*, 384, 440-451.
- HUANG, K. L., MASHL, R. J., WU, Y., RITTER, D. I., WANG, J., OH, C., PACZKOWSKA, M., REYNOLDS, S., WYCZALKOWSKI, M. A., OAK, N., SCOTT, A. D., KRASSOWSKI, M., CHERNIACK, A. D., HOULAHAN, K. E., JAYASINGHE, R., WANG, L. B., ZHOU, D. C., LIU, D., CAO, S., KIM, Y. W., KOIRE, A., MCMICHAEL, J. F., HUETHAGOWDER, V., KIM, T. B., HAHN, A., WANG, C., MCLELLAN, M. D., AL-MULLA, F., JOHNSON, K. J., CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N., LICHTARGE, O., BOUTROS, P. C., RAPHAEL, B., LAZAR, A. J., ZHANG, W., WENDL, M. C., GOVINDAN, R., JAIN, S., WHEELER, D., KULKARNI, S., DIPERSIO, J. F., REIMAND, J., MERIC-BERNSTAM, F., CHEN, K., SHMULEVICH, I., PLON, S. E., CHEN, F.

- & DING, L. 2018. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell*, 173, 355-370 e14.
- HUTTELOVA, R., KLEIBL, Z., REZATOVA, J., KRUTILKOVA, V., FORETOVA, L., NOVOTNY, J., KOTLAS, J., ZIKAN, M. & POHLREICH, P. 2009. [Prerequisites for preimplantation genetic diagnosis (PGD in carriers of mutations responsible for hereditary cancers)]. *Klin Onkol*, 22 Suppl, S69-74.
- CHAU, C., VAN DOORN, R., VAN POPPELEN, N. M., VAN DER STOEP, N., MENSENKAMP, A. R., SIJMONS, R. H., VAN PAASSEN, B. W., VAN DEN OUWELAND, A. M. W., NAUS, N. C., VAN DER HOUT, A. H., POTJER, T. P., BLEEKER, F. E., WEVERS, M. R., VAN HEST, L. P., JONGMANS, M. C. J., MARINKOVIC, M., BLEEKER, J. C., JAGER, M. J., LUYTEN, G. P. M. & NIELSEN, M. 2019. Families with BAP1-Tumor Predisposition Syndrome in The Netherlands: Path to Identification and a Proposal for Genetic Screening Guidelines. *Cancers (Basel)*, 11, 1114.
- CHEN, J., BAE, E., ZHANG, L., HUGHES, K., PARMIGIANI, G., BRAUN, D. & REBBECK, T. R. 2020. Penetrance of Breast and Ovarian Cancer in Women Who Carry a BRCA1/2 Mutation and Do Not Use Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy: An Updated Meta-Analysis. *JNCI Cancer Spectr*, 4, pkaa029.
- JENSEN, M. R., JELSIG, A. M., GERDES, A. M., HOLMICH, L. R., KAINU, K. H., LORENTZEN, H. F., HANSEN, M. H., BAK, M., JOHANSSON, P. A., HAYWARD, N. K., VAN OVEREEM HANSEN, T. & WADT, K. A. W. 2023. TINF2 is a major susceptibility gene in Danish patients with multiple primary melanoma. *HGG Adv*, 4, 100225.
- JOHNATTY, S. E., PESARAN, T., DOLINSKY, J., YUSSUF, A., LADUCA, H., JAMES, P. A., O'MARA, T. A. & SPURDLE, A. B. 2021. Case-case analysis addressing ascertainment bias for multigene panel testing implicates BRCA1 and PALB2 in endometrial cancer. *Hum Mutat*, 42, 1265-1278.
- KANWAL, F., KRAMER, J. R., MAPAKSHI, S., NATARAJAN, Y., CHAYANUPATKUL, M., RICHARDSON, P. A., LI, L., DESIDERIO, R., THRIFT, A. P., ASCH, S. M., CHU, J. & EL-SERAG, H. B. 2018. Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 155, 1828-1837 e2.
- KARPEL, H. C., CHERN, J. Y., SMITH, J. M., SMITH, A. J. & POTHURI, B. 2022. Utility of germline multi-gene panel testing in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 165, 546-551.
- KAWAKAMI, A. & FISHER, D. E. 2017. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Invest*, 97, 649-656.
- KEW, M. C. 2003. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int*, 23, 405-9.
- KLEIBL, Z. & KRISTENSEN, V. N. 2016. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast*, 28, 136-44.
- KLEIBLOVA, P., STOLAROVA, L., KRIZOVA, K., LHOTA, F., HOJNY, J., ZEMANKOVA, P., HAVRANEK, O., VOCKA, M., CERNA, M., LHOTOVA, K., BORECKA, M., JANATOVA, M., SOUKUPOVA, J., SEVCIK, J., ZIMOVJANOVA, M., KOTLAS, J., PANCZAK, A., VESELA, K., CERVENKOVA, J., SCHNEIDEROVA, M., BUROCZIOVA, M., BURDOVA, K., STRANECKY, V., FORETOVA, L., MACHACKOVA, E., TAVANDZIS, S., KMOCH, S., MACUREK, L. & KLEIBL, Z. 2019. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer*, 145, 1782-1797.

- KLIMKOWSKI, S., IBRAHIM, M., IBARRA ROVIRA, J. J., ELSHIKH, M., JAVADI, S., KLEKERS, A. R., ABUSAIF, A. A., MOAWAD, A. W., ALI, K. & ELSAYES, K. M. 2021. Peutz-Jeghers Syndrome and the Role of Imaging: Pathophysiology, Diagnosis, and Associated Cancers. *Cancers (Basel)*, 13.
- KOCZKOWSKA, M., KRAWCZYNSKA, N., STUKAN, M., KUZNIACKA, A., BROZEK, I., SNIADOCKI, M., DEBNIAK, J., WYDRA, D., BIERNAT, W., KOZLOWSKI, P., LIMON, J., WASAG, B. & RATAJSKA, M. 2018. Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients. *Cancers* [Online], 10. Available: [https://mdpi-res.com/d\\_attachment/cancers/cancers-10-00442/article\\_deploy/cancers-10-00442-v2.pdf?version=1542278060](https://mdpi-res.com/d_attachment/cancers/cancers-10-00442/article_deploy/cancers-10-00442-v2.pdf?version=1542278060).
- KRIVOKUCA, A., BOLJEVIC, I., JOVANDIC, S., MAGIC, Z., MANDIC, A., TOMASEVIC, Z. & BRANKOVIC-MAGIC, M. 2019. Germline mutations in cancer susceptibility genes in high grade serous ovarian cancer in Serbia. *J Hum Genet*, 64, 281-290.
- KUHLMAN, J. J., FRIER, Q. J., SUMARRIVA, D., OBERLEY, M., BOLTON, D. & DEVERAS, R. A. 2021. Germline VHL Mutation Discovered in Association with EGFR-Positive Lung Cancer and Metachronous Hepatocellular Carcinoma: A Case Report. *Case Rep Oncol*, 14, 1392-1398.
- KUCHENBAECKER, K. B., HOPPER, J. L., BARNES, D. R., PHILLIPS, K. A., MOOIJ, T. M., ROOS-BLOM, M. J., JERVIS, S., VAN LEEUWEN, F. E., MILNE, R. L., ANDRIEU, N., GOLDFAR, D. E., TERRY, M. B., ROOKUS, M. A., EASTON, D. F., ANTONIOU, A. C., BRCA, CONSORTIUM, B. C., MCGUFFOG, L., EVANS, D. G., BARROWDALE, D., FROST, D., ADLARD, J., ONG, K. R., IZATT, L., TISCHKOWITZ, M., EELES, R., DAVIDSON, R., HODGSON, S., ELLIS, S., NOGUES, C., LASSET, C., STOPPA-LYONNET, D., FRICKER, J. P., FAIVRE, L., BERTHET, P., HOONING, M. J., VAN DER KOLK, L. E., KETS, C. M., ADANK, M. A., JOHN, E. M., CHUNG, W. K., ANDRULIS, I. L., SOUTHEY, M., DALY, M. B., BUYS, S. S., OSORIO, A., ENGEL, C., KAST, K., SCHMUTZLER, R. K., CALDES, T., JAKUBOWSKA, A., SIMARD, J., FRIEDLANDER, M. L., MCLACHLAN, S. A., MACHACKOVA, E., FORETOVA, L., TAN, Y. Y., SINGER, C. F., OLAH, E., GERDES, A. M., ARVER, B. & OLSSON, H. 2017. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 317, 2402-2416.
- KULKARNI, A. & CARLEY, H. 2016. Advances in the recognition and management of hereditary cancer. *Br Med Bull*, 120, 123-138.
- KURIAN, A. W., HUGHES, E., HANDORF, E. A., GUTIN, A., ALLEN, B., HARTMAN, A. R. & HALL, M. J. 2017. Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. *JCO Precis Oncol*, 1, 1-12.
- KURIAN, A. W., WARD, K. C., HOWLADER, N., DEAPEN, D., HAMILTON, A. S., MARIOTTO, A., MILLER, D., PENBERTHY, L. S. & KATZ, S. J. 2019. Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients. *J Clin Oncol*, 37, 1305-1315.
- KURUMIZAKA, H., IKAWA, S., NAKADA, M., ENOMOTO, R., KAGAWA, W., KINEBUCHI, T., YAMAZOE, M., YOKOYAMA, S. & SHIBATA, T. 2002. Homologous pairing and ring and filament structure formation activities of the human Xrcc2\*Rad51D complex. *J Biol Chem*, 277, 14315-20.
- LADUCA, H., POLLEY, E. C., YUSSUF, A., HOANG, L., GUTIERREZ, S., HART, S. N., YADAV, S., HU, C., NA, J., GOLDFAR, D. E., FULK, K., SMITH, L. P.,



- HORTON, C., PROFATO, J., PESARAN, T., GAU, C. L., PRONOLD, M., DAVIS, B. T., CHAO, E. C., COUCH, F. J. & DOLINSKY, J. S. 2020. A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genet Med*, 22, 407-415.
- LAW, M. H., BISHOP, D. T., LEE, J. E., BROSSARD, M., MARTIN, N. G., MOSES, E. K., SONG, F., BARRETT, J. H., KUMAR, R., EASTON, D. F., PHAROAH, P. D. P., SWERDLOW, A. J., KYPREOU, K. P., TAYLOR, J. C., HARLAND, M., RANDERSON-MOOR, J., AKSLEN, L. A., ANDRESEN, P. A., AVRIL, M. F., AZIZI, E., SCARRA, G. B., BROWN, K. M., DEBNAK, T., DUFFY, D. L., ELDER, D. E., FANG, S., FRIEDMAN, E., GALAN, P., GHIORZO, P., GILLANDERS, E. M., GOLDSTEIN, A. M., GRUIS, N. A., HANSSON, J., HELSING, P., HOCEVAR, M., HOIOM, V., INGVAR, C., KANETSKY, P. A., CHEN, W. V., GENO, M. E. L. C., ESSEN-HEIDELBERG, I., GROUP, S. D. H. S., Q, M., INVESTIGATORS, Q., INVESTIGATORS, A., GROUP, A. M. S., LANDI, M. T., LANG, J., LATHROP, G. M., LUBINSKI, J., MACKIE, R. M., MANN, G. J., MOLVEN, A., MONTGOMERY, G. W., NOVAKOVIC, S., OLSSON, H., PUIG, S., PUIG-BUTILLE, J. A., QURESHI, A. A., RADFORD-SMITH, G. L., VAN DER STOEP, N., VAN DOORN, R., WHITEMAN, D. C., CRAIG, J. E., SCHADENDORF, D., SIMMS, L. A., BURDON, K. P., NYHOLT, D. R., POOLEY, K. A., ORR, N., STRATIGOS, A. J., CUST, A. E., WARD, S. V., HAYWARD, N. K., HAN, J., SCHULZE, H. J., DUNNING, A. M., BISHOP, J. A. N., DEMENAI, F., AMOS, C. I., MACGREGOR, S. & ILES, M. M. 2015. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet*, 47, 987-995.
- LE, L., ESCOBAR, I. E., HO, T., LEFKOVITH, A. J., LATTERI, E., HALTAUFDERHYDE, K. D., DENNIS, M. K., PLOWRIGHT, L., SVIDERSKAYA, E. V., BENNETT, D. C., OANCEA, E. & MARKS, M. S. 2020. SLC45A2 protein stability and regulation of melanosome pH determine melanocyte pigmentation. *Mol Biol Cell*, 31, 2687-2702.
- LEON-CASTILLO, A., BRITTON, H., MCCONECHY, M. K., MCALPINE, J. N., NOUT, R., KOMMOSS, S., BRUCKER, S. Y., CARLSON, J. W., EPSTEIN, E., RAU, T. T., BOSSE, T., CHURCH, D. N. & GILKS, C. B. 2020. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol*, 250, 323-335.
- LEVINE, M. D., PEARLMAN, R., HAMPEL, H., COSGROVE, C., COHN, D., CHASSEN, A., SUAREZ, A., BARRINGTON, D. A., MCELROY, J. P., WAGGONER, S., NAKAYAMA, J., BILLINGSLEY, C., RESNICK, K., ANDREWS, S., SINGH, S., JENISON, E., CLEMENTS, A., NEFF, R., GOODFELLOW, P. J., OHIO, P. & TREATMENT OF ENDOMETRIAL CANCER INITIATIVE STUDY, G. 2021. Up-Front Multigene Panel Testing for Cancer Susceptibility in Patients With Newly Diagnosed Endometrial Cancer: A Multicenter Prospective Study. *JCO Precis Oncol*, 5, 1588-1602.
- LHOTOVA, K., STOLAROVA, L., ZEMANKOVA, P., VOCKA, M., JANATOVA, M., BORECKA, M., CERNA, M., JELINKOVA, S., KRAL, J., VOLKOVA, Z., URBANOVA, M., KLEIBLOVA, P., MACHACKOVA, E., FORETOVA, L., HAZOVA, J., VASICKOVA, P., LHOTA, F., KOUDOVA, M., CERNA, L., TAVANDZIS, S., INDRAKOVA, J., HRUSKOVA, L., KOSAROVA, M., VRTEL, R., STRANECKY, V., KMOCH, S., ZIKAN, M., MACUREK, L., KLEIBL, Z. & SOUKUPOVA, J. 2020. Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*, 12, 956.

- LI, X., WU, Y., SUO, P., LIU, G., LI, L., ZHANG, X., CHEN, S., XU, M. & SONG, L. 2020. Identification of a novel germline frameshift mutation p.D300fs of PMS1 in a patient with hepatocellular carcinoma: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*, 99, e19076.
- LILYQUIST, J., LADUCA, H., POLLEY, E., DAVIS, B. T., SHIMELIS, H., HU, C., HART, S. N., DOLINSKY, J. S., COUCH, F. J. & GOLDFAR, D. E. 2017. Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls. *Gynecol Oncol*, 147, 375-380.
- LIU, Y., CHI, W., TAO, L., WANG, G., DEEPAK, R., SHENG, L., CHEN, T., FENG, Y., CAO, X., CHENG, L., ZHAO, X., LIU, X., DENG, H., FAN, H., JIANG, P. & CHEN, L. 2022. Ablation of Proton/Glucose Exporter SLC45A2 Enhances Melanosomal Glycolysis to Inhibit Melanin Biosynthesis and Promote Melanoma Metastasis. *J Invest Dermatol*, 142, 2744-2755 e9.
- LIU, Y. & SHEIKH, M. S. 2014. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol*, 6, 228.
- LLOVET, J. M., BRU, C. & BRUIX, J. 1999. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*, 19, 329-38.
- LLOVET, J. M., KELLEY, R. K., VILLANUEVA, A., SINGAL, A. G., PIKARSKY, E., ROAYAIE, S., LENCIONI, R., KOIKE, K., ZUCMAN-ROSSI, J. & FINN, R. S. 2021. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 7, 6.
- LONDON, T. B., BARBER, L. J., MOSEDALE, G., KELLY, G. P., BALASUBRAMANIAN, S., HICKSON, I. D., BOULTON, S. J. & HIOM, K. 2008. FANCDJ is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts. *J Biol Chem*, 283, 36132-9.
- LONG, B., LILYQUIST, J., WEAVER, A., HU, C., GNANAOLIVU, R., LEE, K. Y., HART, S. N., POLLEY, E. C., BAKKUM-GAMEZ, J. N., COUCH, F. J. & DOWDY, S. C. 2019. Cancer susceptibility gene mutations in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 152, 20-25.
- LOVEDAY, C., TURNBULL, C., RAMSAY, E., HUGHES, D., RUARK, E., FRANKUM, J. R., BOWDEN, G., KALMYRZAEV, B., WARREN-PERRY, M., SNAPE, K., ADLARD, J. W., BARWELL, J., BERG, J., BRADY, A. F., BREWER, C., BRICE, G., CHAPMAN, C., COOK, J., DAVIDSON, R., DONALDSON, A., DOUGLAS, F., GREENHALGH, L., HENDERSON, A., IZATT, L., KUMAR, A., LALLOO, F., MIEDZYBRODZKA, Z., MORRISON, P. J., PATERSON, J., PORTEOUS, M., ROGERS, M. T., SHANLEY, S., WALKER, L., BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY, C., ECCLES, D., EVANS, D. G., RENWICK, A., SEAL, S., LORD, C. J., ASHWORTH, A., REIS-FILHO, J. S., ANTONIOU, A. C. & RAHMAN, N. 2011. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet*, 43, 879-882.
- LU, H. M., LI, S., BLACK, M. H., LEE, S., HOINESS, R., WU, S., MU, W., HUETHER, R., CHEN, J., SRIDHAR, S., TIAN, Y., MCFARLAND, R., DOLINSKY, J., TIPPIN DAVIS, B., MEXAL, S., DUNLOP, C. & ELLIOTT, A. 2019. Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA Oncol*, 5, 51-57.
- LU, K. H., DINH, M., KOHLMANN, W., WATSON, P., GREEN, J., SYNGAL, S., BANDIPALLIAM, P., CHEN, L. M., ALLEN, B., CONRAD, P., TERDIMAN, J., SUN, C., DANIELS, M., BURKE, T., GERSHENSON, D. M., LYNCH, H., LYNCH, P. & BROADDUS, R. R. 2005. Gynecologic cancer as a "sentinel cancer"

- for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Obstet Gynecol*, 105, 569-74.
- MAKKER, V., MACKAY, H., RAY-COQUARD, I., LEVINE, D. A., WESTIN, S. N., AOKI, D. & OAKNIN, A. 2021. Endometrial cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 7, 88.
- MARRERO, J. A., KULIK, L. M., SIRLIN, C. B., ZHU, A. X., FINN, R. S., ABECASSIS, M. M., ROBERTS, L. R. & HEIMBACH, J. K. 2018. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 68, 723-750.
- MASSON, J. Y., STASIAK, A. Z., STASIAK, A., BENSON, F. E. & WEST, S. C. 2001. Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8440-6.
- MATULONIS, U. A., SOOD, A. K., FALLOWFIELD, L., HOWITT, B. E., SEHOULI, J. & KARLAN, B. Y. 2016. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16061.
- MATZ, M., COLEMAN, M. P., SANT, M., CHIRLAQUE, M. D., VISSER, O., GORE, M., ALLEMANI, C. & THE, C. W. G. 2017. The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2). *Gynecol Oncol*, 144, 405-413.
- MCGUIGAN, A., WHITWORTH, J., ANDREOU, A., HEARN, T., GENOMICS ENGLAND RESEARCH, C., TISCHKOWITZ, M. & MAHER, E. R. 2022. Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS): an update. *Eur J Hum Genet*, 30, 265-270.
- MELIS, C., ROGIERS, A., BECHTER, O. & VAN DEN OORD, J. J. 2017. Molecular genetic and immunotherapeutic targets in metastatic melanoma. *Virchows Archiv*, 471, 281-293.
- MEYER, P., STAPELMANN, H., FRANK, B., VARON, R., BURWINKEL, B., SCHMITT, C., BOETTGER, M. B., KLAES, R., SPERLING, K., HEMMINKI, K. & KAMMERER, S. 2007. Molecular genetic analysis of NBS1 in German melanoma patients. *Melanoma Res*, 17, 109-16.
- MEZINA, A., PHILIPS, N., BOGUS, Z., EREZ, N., XIAO, R., FAN, R., OLTHOFF, K. M., REDDY, K. R., SAMADDER, N. J., NIELSEN, S. M., HATCHELL, K. E., ESPLIN, E. D., RUSTGI, A. K., KATONA, B. W., HOTEIT, M. A., NATHANSON, K. L. & WANGENSTEEN, K. J. 2021. Multigene Panel Testing in Individuals With Hepatocellular Carcinoma Identifies Pathogenic Germline Variants. *JCO Precis Oncol*, 5.
- MIKI, Y., SWENSEN, J., SHATTUCK-EIDENS, D., FUTREAL, P. A., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S., LIU, Q., COCHRAN, C., BENNETT, L. M., DING, W. & ET AL. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266, 66-71.
- MORDEN, C. R., FARRELL, A. C., SLIWOWSKI, M., LICHTENSZTEJN, Z., ALTMAN, A. D., NACHTIGAL, M. W. & MCMANUS, K. J. 2021. Chromosome instability is prevalent and dynamic in high-grade serous ovarian cancer patient samples. *Gynecol Oncol*, 161, 769-778.
- MORGAN, R. D., BURGHEL, G. J., FLAUM, N., BULMAN, M., CLAMP, A. R., HASAN, J., MITCHELL, C. L., SCHLECHT, H., WOODWARD, E. R., LALLO, F. I., CROSBIE, E. J., EDMONDSON, R. J., WALLACE, A. J., JAYSON, G. C. & EVANS, D. G. R. 2019. Prevalence of germline pathogenic BRCA1/2 variants in sequential epithelial ovarian cancer cases. *J Med Genet*, 56, 301-307.
- NELSON, N. D., DODSON, L. M., ESCUDERO, L., SUKUMAR, A. T., WILLIAMS, C. L., MIHALEK, I., BALDAN, A., BAIRD, D. M. & BERTUCH, A. A. 2018. The C-Terminal Extension Unique to the Long Isoform of the Shelterin Component TIN2

- Enhances Its Interaction with TRF2 in a Phosphorylation- and Dyskeratosis Congenita Cluster-Dependent Fashion. *Mol Cell Biol*, 38.
- NICOLAS, E., GOLEMIS, E. A. & ARORA, S. 2016. POLD1: Central mediator of DNA replication and repair, and implication in cancer and other pathologies. *Gene*, 590, 128-41.
- NICOLOSI, P., LEDET, E., YANG, S., MICHALSKI, S., FRESCHI, B., O'LEARY, E., ESPLIN, E. D., NUSSBAUM, R. L. & SARTOR, O. 2019. Prevalence of Germline Variants in Prostate Cancer and Implications for Current Genetic Testing Guidelines. *JAMA Oncol*, 5, 523-528.
- NIELSEN, F. C., VAN OVEREEM HANSEN, T. & SORENSEN, C. S. 2016. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer*, 16, 599-612.
- NICHOLS, K. E., MALKIN, D., GARBER, J. E., FRAUMENI, J. F., JR. & LI, F. P. 2001. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 83-7.
- OGI, T., LIMSIRICHAIKUL, S., OVERMEER, R. M., VOLKER, M., TAKENAKA, K., CLONEY, R., NAKAZAWA, Y., NIIMI, A., MIKI, Y., JASPERS, N. G., MULLENDERS, L. H., YAMASHITA, S., FOUSTERI, M. I. & LEHMANN, A. R. 2010. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell*, 37, 714-27.
- OTAHALOVA, B., VOLKOVA, Z., SOUKUPOVA, J., KLEIBLOVA, P., JANATOVA, M., VOCKA, M., MACUREK, L. & KLEIBL, Z. 2023. Importance of Germline and Somatic Alterations in Human MRE11, RAD50, and NBN Genes Coding for MRN Complex. *Int J Mol Sci*, 24.
- OZTURK, M. 1999. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis*, 19, 235-42.
- PASTORINO, L., ANDREOTTI, V., DALMASSO, B., VANNI, I., CICCARESE, G., MANDALA, M., SPADOLA, G., PIZZICHETTA, M. A., PONTI, G., TIBILETTI, M. G., SALA, E., GENUARDI, M., CHIURAZZI, P., MACCANTI, G., MANOUKIAN, S., SESTINI, S., DANESI, R., ZAMPIGA, V., LA STARZA, R., STANGANELLI, I., BALLESTRERO, A., MASTRACCI, L., GRILLO, F., SCIALLERO, S., CECCHI, F., TANDA, E. T., SPAGNOLO, F., QUEIROLO, P., ITALIAN MELANOMA, I., GOLDSTEIN, A. M., BRUNO, W. & GHIORZO, P. 2020. Insights into Genetic Susceptibility to Melanoma by Gene Panel Testing: Potential Pathogenic Variants in ACD, ATM, BAP1, and POT1. *Cancers (Basel)*, 12.
- PAVANELLO, M., CHAN, I. H., ARIFF, A., PHAROAH, P. D., GAYTHER, S. A. & RAMUS, S. J. 2020. Rare Germline Genetic Variants and the Risks of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*, 12.
- PEARCE, C. L., CHUNG, K., PIKE, M. C. & WU, A. H. 2009. Increased ovarian cancer risk associated with menopausal estrogen therapy is reduced by adding a progestin. *Cancer*, 115, 531-9.
- PECORELLI, S. 2009. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*, 105, 103-4.
- PELUSI, S., BASELLI, G., PIETRELLI, A., DONGIOVANNI, P., DONATI, B., MCCAIN, M. V., MERONI, M., FRACANZANI, A. L., ROMAGNOLI, R., PETTA, S., GRIECO, A., MIELE, L., SOARDO, G., BUGIANESI, E., FARGION, S., AGHEMO, A., D'AMBROSIO, R., XING, C., ROMEO, S., DE FRANCESCO, R., REEVES, H. L. & VALENTI, L. V. C. 2019. Rare Pathogenic Variants Predispose to Hepatocellular Carcinoma in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*, 9, 3682.

- PENNINGTON, K. P. & SWISHER, E. M. 2012. Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol*, 124, 347-53.
- PEREZ-CABORNERO, L., INFANTE SANZ, M., VELASCO SAMPEDRO, E., LASTRA ARAS, E., ACEDO BECARES, A., MINER PINO, C. & DURAN DOMINGUEZ, M. 2011. Frequency of rearrangements in Lynch syndrome cases associated with MSH2: characterization of a new deletion involving both EPCAM and the 5' part of MSH2. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 1556-62.
- PLASKOCINSKA, I., SHIPMAN, H., DRUMMOND, J., THOMPSON, E., BUCHANAN, V., NEWCOMBE, B., HODGKIN, C., BARTER, E., RIDLEY, P., NG, R., MILLER, S., DANN, A., LICENCE, V., WEBB, H., TAN, L. T., DALY, M., AYERS, S., RUFFORD, B., EARL, H., PARKINSON, C., DUNCAN, T., JIMENEZ-LINAN, M., SAGOO, G. S., ABBS, S., HULBERT-WILLIAMS, N., PHAROAH, P., CRAWFORD, R., BRENTON, J. D. & TISCHKOWITZ, M. 2016. New paradigms for BRCA1/BRCA2 testing in women with ovarian cancer: results of the Genetic Testing in Epithelial Ovarian Cancer (GTEOC) study. *J Med Genet*, 53, 655-61.
- POSPIECH, H. & SYVAOJA, J. E. 2003. DNA polymerase epsilon - more than a polymerase. *ScientificWorldJournal*, 3, 87-104.
- PRAT, J. 2012. New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol*, 23 Suppl 10, x111-7.
- RAGLAN, O., KALLIALA, I., MARKOZANNES, G., CIVIDINI, S., GUNTER, M. J., NAUTIYAL, J., GABRA, H., PARASKEVAIDIS, E., MARTIN-HIRSCH, P., TSILIDIS, K. K. & KYRGIU, M. 2019. Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. *Int J Cancer*, 145, 1719-1730.
- RAHMAN, N. 2014. Mainstreaming genetic testing of cancer predisposition genes. *Clin Med (Lond)*, 14, 436-9.
- RAJKUMAR, S. & WATSON, I. R. 2016. Molecular characterisation of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies. *Br J Cancer*, 115, 145-55.
- RAMUS, S. J., SONG, H., DICKS, E., TYRER, J. P., ROSENTHAL, A. N., INTERMAGGIO, M. P., FRASER, L., GENTRY-MAHARAJ, A., HAYWARD, J., PHILPOTT, S., ANDERSON, C., EDLUND, C. K., CONTI, D., HARRINGTON, P., BARROWDALE, D., BOWTELL, D. D., ALSOP, K., MITCHELL, G., GROUP, A. S., CICEK, M. S., CUNNINGHAM, J. M., FRIDLEY, B. L., ALSOP, J., JIMENEZ-LINAN, M., POBLETE, S., LELE, S., SUCHESTON-CAMPBELL, L., MOYSICH, K. B., SIEH, W., MCGUIRE, V., LESTER, J., BOGDANOVA, N., DURST, M., HILLEMANN, P., OVARIAN CANCER ASSOCIATION, C., ODUNSI, K., WHITTEMORE, A. S., KARLAN, B. Y., DORK, T., GOODE, E. L., MENON, U., JACOBS, I. J., ANTONIOU, A. C., PHAROAH, P. D. & GAYTHER, S. A. 2015. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 107, djv214.
- READ, J., WADT, K. A. & HAYWARD, N. K. 2016. Melanoma genetics. *J Med Genet*, 53, 1-14.
- RENEHAN, A. G., ZWAHLEN, M. & EGGER, M. 2015. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer*, 15, 484-98.
- RING, K. L., BRUEGL, A. S., ALLEN, B. A., ELKIN, E. P., SINGH, N., HARTMAN, A. R., DANIELS, M. S. & BROADDUS, R. R. 2016. Germline multi-gene hereditary cancer panel testing in an unselected endometrial cancer cohort. *Mod Pathol*, 29, 1381-1389.

- ROHLIN, A., ZAGORAS, T., NILSSON, S., LUNDSTAM, U., WAHLSTROM, J., HULTEN, L., MARTINSSON, T., KARLSSON, G. B. & NORDLING, M. 2014. A mutation in POLE predisposing to a multi-tumour phenotype. *Int J Oncol*, 45, 77-81.
- RYAN, N. A. J., MORRIS, J., GREEN, K., LALLOO, F., WOODWARD, E. R., HILL, J., CROSBIE, E. J. & EVANS, D. G. 2017. Association of Mismatch Repair Mutation With Age at Cancer Onset in Lynch Syndrome: Implications for Stratified Surveillance Strategies. *JAMA Oncol*, 3, 1702-1706.
- RYBICKA, M., WOZIWODZKA, A., SZNARKOWSKA, A., ROMANOWSKI, T., STALKE, P., DRECZEWSKI, M., VERRIER, E. R., BAUMERT, T. F. & BIELAWSKI, K. P. 2020. Liver Cirrhosis in Chronic Hepatitis B Patients Is Associated with Genetic Variations in DNA Repair Pathway Genes. *Cancers (Basel)*, 12.
- RYSKA, A., HORKY, O., BERKOVCOVA, J., TICHA, I., KALINOVA, M., MATEJCKOVA, M., BODAY, A., DRABEK, J., MARTINEK, P., SIMOVA, J., SIEGLOVA, K. & VOSMIKOVA, H. 2017. [Malignant Melanoma - from Classical Histology towards Molecular Genetic Testing]. *Klin Onkol*, 30, 182-189.
- SAMADDER, N. J., RIEGERT-JOHNSON, D., BOARDMAN, L., RHODES, D., WICK, M., OKUNO, S., KUNZE, K. L., GOLAFSHAR, M., USON, P. L. S., JR., MOUNTJOY, L., ERTZ-ARCHAMBAULT, N., PATEL, N., RODRIGUEZ, E. A., LIZAOLA-MAYO, B., LEHRER, M., THORPE, C. S., YU, N. Y., ESPLIN, E. D., NUSSBAUM, R. L., SHARP, R. R., AZEVEDO, C., KLINT, M., HAGER, M., MACKLIN-MANTIA, S., BRYCE, A. H., BEKAI-SAAB, T. S., SEKULIC, A. & STEWART, A. K. 2021. Comparison of Universal Genetic Testing vs Guideline-Directed Targeted Testing for Patients With Hereditary Cancer Syndrome. *JAMA Oncol*, 7, 230-237.
- SANGIOVANNI, A., PRATI, G. M., FASANI, P., RONCHI, G., ROMEO, R., MANINI, M., DEL NINNO, E., MORABITO, A. & COLOMBO, M. 2006. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology*, 43, 1303-10.
- SETIAWAN, V. W., YANG, H. P., PIKE, M. C., MCCANN, S. E., YU, H., XIANG, Y. B., WOLK, A., WENTZENSEN, N., WEISS, N. S., WEBB, P. M., VAN DEN BRANDT, P. A., VAN DE VIJVER, K., THOMPSON, P. J., AUSTRALIAN NATIONAL ENDOMETRIAL CANCER STUDY, G., STROM, B. L., SPURDLE, A. B., SOSLOW, R. A., SHU, X. O., SCHAIRER, C., SACERDOTE, C., ROHAN, T. E., ROBIEN, K., RISCH, H. A., RICCI, F., REBBECK, T. R., RASTOGI, R., PRESCOTT, J., POLIDORO, S., PARK, Y., OLSON, S. H., MOYSICH, K. B., MILLER, A. B., MCCULLOUGH, M. L., MATSUNO, R. K., MAGLIOCCO, A. M., LURIE, G., LU, L., LISSOWSKA, J., LIANG, X., LACEY, J. V., JR., KOLONEL, L. N., HENDERSON, B. E., HANKINSON, S. E., HAKANSSON, N., GOODMAN, M. T., GAUDET, M. M., GARCIA-CLOSAS, M., FRIEDENREICH, C. M., FREUDENHEIM, J. L., DOHERTY, J., DE VIVO, I., COURNEYA, K. S., COOK, L. S., CHEN, C., CERHAN, J. R., CAI, H., BRINTON, L. A., BERNSTEIN, L., ANDERSON, K. E., ANTON-CULVER, H., SCHOUTEN, L. J. & HORN-ROSS, P. L. 2013. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol*, 31, 2607-18.
- SHAIN, A. H. & BASTIAN, B. C. 2016. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*, 16, 345-58.
- SHARPLESS, N. E. 2005. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*, 576, 22-38.

- SCHADENDORF, D., FISHER, D. E., GARBE, C., GERSHENWALD, J. E., GROB, J. J., HALPERN, A., HERLYN, M., MARCHETTI, M. A., MCARTHUR, G., RIBAS, A., ROESCH, A. & HAUSCHILD, A. 2015. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15003.
- SINGAL, A. G., MANJUNATH, H., YOPP, A. C., BEG, M. S., MARRERO, J. A., GOPAL, P. & WALJEE, A. K. 2014. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 109, 325-34.
- SLOMINSKI, R. M., SARNA, T., PLONKA, P. M., RAMAN, C., BROZYNA, A. A. & SLOMINSKI, A. T. 2022. Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship. *Front Oncol*, 12, 842496.
- SOUKUPOVA, J., ZEMANKOVA, P., KLEIBLOVA, P., JANATOVA, M. & KLEIBL, Z. 2016. [CZECANCA: CZEch Cancer paNel for Clinical Application-- Design and Optimization of the Targeted Sequencing Panel for the Identification of Cancer Susceptibility in High-risk Individuals from the Czech Republic]. *Klin Onkol*, 29 Suppl 1, S46-54.
- SOUKUPOVA, J., ZEMANKOVA, P., LHOTOVA, K., JANATOVA, M., BORECKA, M., STOLAROVA, L., LHOTA, F., FORETOVA, L., MACHACKOVA, E., STRANECKY, V., TAVANDZIS, S., KLEIBLOVA, P., VOCKA, M., HARTMANNOVA, H., HODANOVA, K., KMOCH, S. & KLEIBL, Z. 2018. Validation of CZECANCA (CZEch CAnCER paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One*, 13, e0195761.
- SPIER, I., HOLZAPFEL, S., ALTMULLER, J., ZHAO, B., HORPAOPAN, S., VOGT, S., CHEN, S., MORAK, M., RAEDER, S., KAYSER, K., STIENEN, D., ADAM, R., NURNBERG, P., PLOTZ, G., HOLINSKI-FEDER, E., LIFTON, R. P., THIELE, H., HOFFMANN, P., STEINKE, V. & ARETZ, S. 2015. Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer*, 137, 320-31.
- SPURDLE, A. B., BOWMAN, M. A., SHAMSANI, J. & KIRK, J. 2017. Endometrial cancer gene panels: clinical diagnostic vs research germline DNA testing. *Mod Pathol*, 30, 1048-1068.
- SRIVASTAVA, A., MIAO, B., SKOPELITOU, D., KUMAR, V., KUMAR, A., PARAMASIVAM, N., BONORA, E., HEMMINKI, K., FORSTI, A. & BANDAPALLI, O. R. 2020. A Germline Mutation in the POT1 Gene Is a Candidate for Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Cancers (Basel)*, 12.
- STOLAROVA, L., JELINKOVA, S., STORCHOVA, R., MACHACKOVA, E., ZEMANKOVA, P., VOCKA, M., KODET, O., KRAL, J., CERNA, M., VOLKOVA, Z., JANATOVA, M., SOUKUPOVA, J., STRANECKY, V., DUNDR, P., FORETOVA, L., MACUREK, L., KLEIBLOVA, P. & KLEIBL, Z. 2020a. Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes. *Biomedicines*, 8, 404.
- STOLAROVA, L., KLEIBLOVA, P., JANATOVA, M., SOUKUPOVA, J., ZEMANKOVA, P., MACUREK, L. & KLEIBL, Z. 2020b. CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells*, 9.
- STRADELLA, A., DEL VALLE, J., ROFES, P., FELIUBADALO, L., GRAU GARCES, E., VELASCO, A., GONZALEZ, S., VARGAS, G., IZQUIERDO, A., CAMPOS, O., TORNERO, E., NAVARRO, M., BALMANA-GELPI, J., CAPELLA, G., PINEDA, M., BRUNET, J. & LAZARO, C. 2019. Does multilocus inherited

- neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression? *J Med Genet*, 56, 521-525.
- STRATTON, M. R. & RAHMAN, N. 2008. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet*, 40, 17-22.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- SUSSWEIN, L. R., MARSHALL, M. L., NUSBAUM, R., VOGEL POSTULA, K. J., WEISSMAN, S. M., YACKOWSKI, L., VACCARI, E. M., BISSONNETTE, J., BOOKER, J. K., CREMONA, M. L., GIBELLINI, F., MURPHY, P. D., PINEDA-ALVAREZ, D. E., POLLEVICK, G. D., XU, Z., RICHARD, G., BALE, S., KLEIN, R. T., HRUSKA, K. S. & CHUNG, W. K. 2016. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med*, 18, 823-32.
- TAFE, L. J., RIGGS, E. R. & TSONGALIS, G. J. 2014. Lynch syndrome presenting as endometrial cancer. *Clin Chem*, 60, 111-21.
- TAKATA, M., SASAKI, M. S., TACHIIRI, S., FUKUSHIMA, T., SONODA, E., SCHILD, D., THOMPSON, L. H. & TAKEDA, S. 2001. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol*, 21, 2858-66.
- TAN, M. H., MESTER, J. L., NGEOW, J., RYBICKI, L. A., ORLOFF, M. S. & ENG, C. 2012. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res*, 18, 400-7.
- TIAN, W., BI, R., REN, Y., HE, H., SHI, S., SHAN, B., YANG, W., WANG, Q. & WANG, H. 2019. Screening for hereditary cancers in patients with endometrial cancer reveals a high frequency of germline mutations in cancer predisposition genes. *Int J Cancer*, 145, 1290-1298.
- TOSS, A., TOMASELLO, C., RAZZABONI, E., CONTU, G., GRANDI, G., CAGNACCI, A., SCHILDER, R. J. & CORTESI, L. 2015. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int*, 2015, 341723.
- TOVAR, E. A. & GRAVEEL, C. R. 2017. MET in human cancer: germline and somatic mutations. *Ann Transl Med*, 5, 205.
- USON JUNIOR, P. L., KUNZE, K. L., GOLAFSHAR, M. A., RIEGERT-JOHNSON, D., BOARDMAN, L., BORAD, M. J., AHN, D., SONBOL, M. B., FAIGEL, D. O., FUKAMI, N., PANNALA, R., BARRUS, K., MOUNTJOY, L., ESPLIN, E. D., NUSSBAUM, R. L., STEWART, A. K., BEKAI-SAAB, T. & SAMADDER, N. J. 2022. Germline Cancer Susceptibility Gene Testing in Unselected Patients with Hepatobiliary Cancers: A Multi-Center Prospective Study. *Cancer Prev Res (Phila)*, 15, 121-128.
- ÚZIS. 2021. Zdravotní ročenka České republiky.
- VARON, R., SEEMANOVA, E., CHRZANOWSKA, K., HNATEYKO, O., PIEKUTOWSKA-ABRAMCZUK, D., KRAJEWSKA-WALASEK, M., SYKUT-CEGIELSKA, J., SPERLING, K. & REIS, A. 2000. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet*, 8, 900-2.
- VEVERKA, P., JANOVIC, T. & HOFER, C. 2019. Quantitative Biology of Human Shelterin and Telomerase: Searching for the Weakest Point. *Int J Mol Sci*, 20, 3186.
- VIETRI, M. T., D'ELIA, G., CALIENDO, G., CASAMASSIMI, A., FEDERICO, A., PASSARIELLO, L., CIOFFI, M. & MOLINARI, A. M. 2021. Prevalence of



- mutations in BRCA and MMR genes in patients affected with hereditary endometrial cancer. *Med Oncol*, 38, 13.
- VILLA, M., CASSANI, C., GOBBINI, E., BONETTI, D. & LONGHESE, M. P. 2016. Coupling end resection with the checkpoint response at DNA double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci*, 73, 3655-63.
- WALKER, L. C., LATTIMORE, V. L., KVIST, A., KLEIBLOVA, P., ZEMANKOVA, P., DE JONG, L., WIGGINS, G. A. R., HAKKAART, C., CREE, S. L., BEHAR, R., HOUDAYER, C., KCONFAB, I., PARSONS, M. T., KENNEDY, M. A., SPURDLE, A. B. & DE LA HOYA, M. 2019. Comprehensive Assessment of BARD1 Messenger Ribonucleic Acid Splicing With Implications for Variant Classification. *Front Genet*, 10, 1139.
- WEBER-LASSALLE, N., HAUKE, J., RAMSER, J., RICHTERS, L., GROSS, E., BLUMCKE, B., GEHRIG, A., KAHLERT, A. K., MULLER, C. R., HACKMANN, K., HONISCH, E., WEBER-LASSALLE, K., NIEDERACHER, D., BORDE, J., THIELE, H., ERNST, C., ALTMULLER, J., NEIDHARDT, G., NURNBERG, P., KLASCHIK, K., SCHROEDER, C., PLATZER, K., VOLK, A. E., WANG-GOHRKE, S., JUST, W., AUBER, B., KUBISCH, C., SCHMIDT, G., HORVATH, J., WAPPENSCHMIDT, B., ENGEL, C., ARNOLD, N., DWORNICZAK, B., RHIEM, K., MEINDL, A., SCHMUTZLER, R. K. & HAHNEN, E. 2018. BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res*, 20, 7.
- WHITEMAN, D. C., WATT, P., PURDIE, D. M., HUGHES, M. C., HAYWARD, N. K. & GREEN, A. C. 2003. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 95, 806-12.
- WIEME, G., KRAL, J., ROSSEEL, T., ZEMANKOVA, P., PARTON, B., VOCKA, M., VAN HEETVELDE, M., KLEIBLOVA, P., BLAUMEISER, B., SOUKUPOVA, J., VAN DEN ENDE, J., NEHASIL, P., TEJPAN, S., BORECKA, M., GOMEZ GARCIA, E. B., BLOK, M. J., SAFARIKOVA, M., KALOUSOVA, M., GEBOES, K., DE PUTTER, R., POPPE, B., DE LEENEER, K., KLEIBL, Z., JANATOVA, M. & CLAES, K. B. M. 2021. Prevalence of Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposing Genes in Czech and Belgian Pancreatic Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, 13, 4430.
- WIN, A. K., DOWTY, J. G., CLEARY, S. P., KIM, H., BUCHANAN, D. D., YOUNG, J. P., CLENDENNING, M., ROSTY, C., MACINNIS, R. J., GILES, G. G., BOUSSIOUTAS, A., MACRAE, F. A., PARRY, S., GOLDBLATT, J., BARON, J. A., BURNETT, T., LE MARCHAND, L., NEWCOMB, P. A., HAILE, R. W., HOPPER, J. L., COTTERCHIO, M., GALLINGER, S., LINDOR, N. M., TUCKER, K. M., WINSHIP, I. M. & JENKINS, M. A. 2014. Risk of colorectal cancer for carriers of mutations in MUTYH, with and without a family history of cancer. *Gastroenterology*, 146, 1208-11.e1-5.
- WOOSTER, R., BIGNELL, G., LANCASTER, J., SWIFT, S., SEAL, S., MANGION, J., COLLINS, N., GREGORY, S., GUMBS, C. & MICKLEM, G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378, 789-92.
- XU, X., JIN, D., DURGAN, J. & HALL, A. 2013. LKB1 controls human bronchial epithelial morphogenesis through p114RhoGEF-dependent RhoA activation. *Mol Cell Biol*, 33, 2671-82.
- YEN, T. T., WANG, T. L., FADER, A. N., SHIH, I. M. & GAILLARD, S. 2020. Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Pathol*, 39, 26-35.

- YOKOYAMA, S., WOODS, S. L., BOYLE, G. M., AOUDE, L. G., MACGREGOR, S., ZISMANN, V., GARTSIDE, M., CUST, A. E., HAQ, R., HARLAND, M., TAYLOR, J. C., DUFFY, D. L., HOLOHAN, K., DUTTON-REGESTER, K., PALMER, J. M., BONAZZI, V., STARK, M. S., SYMMONS, J., LAW, M. H., SCHMIDT, C., LANAGAN, C., O'CONNOR, L., HOLLAND, E. A., SCHMID, H., MASKIELL, J. A., JETANN, J., FERGUSON, M., JENKINS, M. A., KEFFORD, R. F., GILES, G. G., ARMSTRONG, B. K., AITKEN, J. F., HOPPER, J. L., WHITEMAN, D. C., PHAROAH, P. D., EASTON, D. F., DUNNING, A. M., NEWTON-BISHOP, J. A., MONTGOMERY, G. W., MARTIN, N. G., MANN, G. J., BISHOP, D. T., TSAO, H., TRENT, J. M., FISHER, D. E., HAYWARD, N. K. & BROWN, K. M. 2011. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*, 480, 99-103.
- ZHANG, Y., XIONG, Y. & YARBROUGH, W. G. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 92, 725-34.
- ZHAO, S., CHEN, L., ZANG, Y., LIU, W., LIU, S., TENG, F., XUE, F. & WANG, Y. 2022. Endometrial cancer in Lynch syndrome. *Int J Cancer*, 150, 7-17.
- ZHEN, Y., XIAO, R., CHEN, X., YUAN, C., SUN, Y. & LI, J. 2018. A non-synonymous polymorphism in NBS1 is associated with progression from chronic hepatitis B virus infection to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Oncotargets Ther*, 11, 563-569.
- ZHOU, Z. X., LUJAN, S. A., BURKHOLDER, A. B., GARBACZ, M. A. & KUNKEL, T. A. 2019. Roles for DNA polymerase delta in initiating and terminating leading strand DNA replication. *Nat Commun*, 10, 3992.
- ZOCCHI, L., LONTANO, A., MERLI, M., DIKA, E., NAGORE, E., QUAGLINO, P., PUIG, S. & RIBERO, S. 2021. Familial Melanoma and Susceptibility Genes: A Review of the Most Common Clinical and Dermoscopic Phenotypic Aspect, Associated Malignancies and Practical Tips for Management. *Journal of Clinical Medicine* [Online], 10. Available: [https://mdpi-res.com/d\\_attachment/jcm/jcm-10-03760/article\\_deploy/jcm-10-03760-v2.pdf?version=1629784553](https://mdpi-res.com/d_attachment/jcm/jcm-10-03760/article_deploy/jcm-10-03760-v2.pdf?version=1629784553).

## Přílohy

### Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

1. Stolarova L, Jelinkova S, Storchova R, Machackova E, Zemankova P, Vocka M, Kodet O, Kral J, Cerna M, Volkova Z, Janatova M, Soukupova J, Stranecky V, Dunder P, Foretova L, Macurek L, Kleiblova P, Kleibl Z. **Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes.** *Biomedicines*. 2020 Oct 9;8(10):404. doi: 10.3390/biomedicines8100404. PMID: 33050356; PMCID: PMC7601281. (IF=4,7)
2. Kral J, Jelinkova S, Zemankova P, Vocka M, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Dostalek L, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyanyan M, Chvojka S, Kalousova M, Kosarova M, Koudova M, Krutilkova V, Machackova E, Nehasil P, Novotny J, Otahalova B, Puchmajerova A, Safarikova M, Slama J, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Zikan M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Kleibl Z, Janatova M. **Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer.** *Oncol Lett*. 2023 Apr 12;25(6):216. doi: 10.3892/ol.2023.13802. PMID: 37153042; PMCID: PMC10157349. (IF=2,9)
3. Lhotova K, Stolarova L, Zemankova P, Vocka M, Janatova M, Borecka M, Cerna M, Jelinkova S, Kral J, Volkova Z, Urbanova M, Kleiblova P, Machackova E, Foretova L, Hazova J, Vasickova P, Lhota F, Koudova M, Cerna L, Tavandzis S, Indrakova J, Hruskova L, Kosarova M, Vrtel R, Stranecky V, Kmoch S, Zikan M, Macurek L, Kleibl Z, Soukupova J. **Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer.** *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 13;12(4):956. doi: 10.3390/cancers12040956. PMID: 32295079; PMCID: PMC7226062. (IF=5,2)
4. Horackova K, Frankova S, Zemankova P, Nehasil P, Cerna M, Neroldova M, Otahalova B, Kral J, Hovhannisyanyan M, Stranecky V, Zima T, Safarikova M, Kalousova M, Consortium C, Novotny J, Sperl J, Borecka M, Jelinkova S, Vocka M, Janatova M, Kleiblova P, Kleibl Z, Jirsa M, Soukupova J. **Low Frequency of Cancer-Predisposition Gene Mutations in Liver Transplant Candidates with Hepatocellular Carcinoma.** *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 29;15(1):201. doi: 10.3390/cancers15010201. PMID: 36612198; PMCID: PMC9818325. (IF=5,2)



Article

# Identification of Germline Mutations in Melanoma Patients with Early Onset, Double Primary Tumors, or Family Cancer History by NGS Analysis of 217 Genes

Lenka Stolarova<sup>1,2,†</sup>, Sandra Jelinkova<sup>1,†</sup>, Radka Storchova<sup>2</sup>, Eva Machackova<sup>3</sup>, Petra Zemankova<sup>1</sup>, Michal Vocka<sup>4</sup>, Ondrej Kodet<sup>5,6,7</sup>, Jan Kral<sup>1</sup>, Marta Cerna<sup>1</sup>, Zuzana Volkova<sup>1</sup>, Marketa Janatova<sup>1</sup>, Jana Soukupova<sup>1</sup>, Viktor Stranecky<sup>8</sup>, Pavel Dundr<sup>9</sup>, Lenka Foretova<sup>3</sup>, Libor Macurek<sup>2</sup>, Petra Kleiblova<sup>10</sup> and Zdenek Kleibl<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University, 128 53 Prague, Czech Republic; lenka.stolarova@lf1.cuni.cz (L.S.); sandra.jelinkova@lf1.cuni.cz (S.J.); petra.zemankova@lf1.cuni.cz (P.Z.); jan.kral@lf1.cuni.cz (J.K.); marta.cerna@lf1.cuni.cz (M.C.); zuzana.klusonova@lf1.cuni.cz (Z.V.); marketa.janatova@lf1.cuni.cz (M.J.); jana.soukupova@lf1.cuni.cz (J.S.)
- <sup>2</sup> Laboratory of Cancer Cell Biology, Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague, Czech Republic; radka.storchova@img.cas.cz (R.S.); libor.macurek@img.cas.cz (L.M.)
- <sup>3</sup> Department of Cancer Epidemiology and Genetics, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic; emachack@mou.cz (E.M.); foretova@mou.cz (L.F.)
- <sup>4</sup> Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; michal.vocka@vfn.cz
- <sup>5</sup> Department of Dermatology and Venereology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; ondrej.kodet@vfn.cz
- <sup>6</sup> Institute of Anatomy, First Faculty of Medicine, Charles University, 128 00 Prague, Czech Republic
- <sup>7</sup> BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, 252 50 Vestec, Czech Republic
- <sup>8</sup> Research Unit for Rare Diseases, Department of Paediatrics and Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 121 00 Prague, Czech Republic; Viktor.Stranecky@lf1.cuni.cz
- <sup>9</sup> Department of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic; pavel.dundr@vfn.cz
- <sup>10</sup> Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic; petra.kleiblova@lf1.cuni.cz
- \* Correspondence: zdenek.kleibl@lf1.cuni.cz; Tel.: +420-22496-5745
- † These authors equally contributed to this work.

Received: 31 August 2020; Accepted: 5 October 2020; Published: 9 October 2020



**Abstract:** Cutaneous melanoma is the deadliest skin malignity with a rising prevalence worldwide. Patients carrying germline mutations in melanoma-susceptibility genes face an increased risk of melanoma and other cancers. To assess the spectrum of germline variants, we analyzed 264 Czech melanoma patients indicated for testing due to early melanoma (at <25 years) or the presence of multiple primary melanoma/melanoma and other cancer in their personal and/or family history. All patients were analyzed by panel next-generation sequencing targeting 217 genes in four groups: high-to-moderate melanoma risk genes, low melanoma risk genes, cancer syndrome genes, and other genes with an uncertain melanoma risk. Population frequencies were assessed in 1479 population-matched controls. Selected *POT1* and *CHEK2* variants were characterized by functional assays. Mutations in clinically relevant genes were significantly more frequent in melanoma patients than in controls (31/264; 11.7% vs. 58/1479; 3.9%;  $p = 2.0 \times 10^{-6}$ ). A total of 9 patients (3.4%) carried mutations in high-to-moderate melanoma risk genes (*CDKN2A*, *POT1*, *ACD*) and 22 (8.3%) patients in other cancer syndrome genes (*NBN*, *BRCA1/2*, *CHEK2*, *ATM*, *WRN*, *RB1*). Mutations in high-to-moderate melanoma risk genes (OR = 52.2; 95%CI 6.6–413.1;  $p = 3.2 \times 10^{-7}$ ) and in other cancer syndrome genes (OR = 2.3; 95%CI 1.4–3.8;  $p = 0.003$ ) were significantly associated with melanoma risk.

We found an increased potential to carry these mutations (OR = 2.9; 95%CI 1.2–6.8) in patients with double primary melanoma, melanoma and other primary cancer, but not in patients with early age at onset. The analysis revealed affected genes in Czech melanoma patients and identified individuals who may benefit from genetic testing and future surveillance management of mutation carriers.

**Keywords:** melanoma; familial melanoma; hereditary cancer predisposition; germline mutations; panel sequencing; NGS

---

## 1. Introduction

With 287,723 newly diagnosed cases and 60,712 fatalities in 2018, cutaneous melanoma remains the deadliest skin malignancy globally. The highest standardized melanoma incidence occurs in Australia and New Zealand; however, European and US patients account for more than 75% of new melanoma cases annually [1]. The GLOBOCAN cancer registry ranks the Czech Republic as 18th among 185 countries in the world in terms of age-standardized melanoma incidence rates (between the USA and Canada) [2].

The risk of melanoma is largely modified by factors influencing individual sensitivity to UV radiation and sunlight exposure, and sunburns during childhood in particular are a major behavioral risk factor [3]. Other individual host factors include the amount, type, and arrangement of cutaneous melanin, the presence of multiple atypical moles (the most frequent precancerous melanoma lesions), and a family history of melanoma [4].

The hereditary component of melanoma development has been assessed in a large prospective study of twins from Nordic countries revealing melanoma heritability with a familial cancer risk of 19.6% and 6.1% for monozygotic and dizygotic twins, respectively, compared with 1.2% for the overall population [5]. The proportion of familial melanoma cases is approximately 5–10%; however, pathogenic germline mutation carriers have been identified in only a minority of the analyzed familial melanoma cases [6].

The major melanoma-susceptibility gene is *CDKN2A*, coding for two alternatively transcribed mRNAs translated into the cyclin-dependent kinase inhibitor p16<sup>INK4</sup> and the tumor suppressor p14<sup>ARF</sup> participating in p53 activation, respectively [7]. Germline *CDKN2A* mutations have been found in about 20–40% of melanoma-prone families (with  $\geq 3$  melanoma cases), but in only 0.2–3% of non-familial melanoma cases [8,9]. Other high-risk but extremely rare germline mutations affect cyclin-dependent kinase 4 (*CDK4*) and BRCA1-associated protein 1 (*BAP1*) genes [10,11]. Germline *CDK4* mutations cluster in exon 2, coding for a domain interacting with p16<sup>INK4</sup> [12]. The *BAP1* protein codes for deubiquitinase, counteracting BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase activity [13]. Hereditary *BAP1* mutations predispose people to hypopigmented skin melanoma, uveal melanoma, mesothelioma, renal cell carcinoma, and other cancers [13]. Other potential high- to moderate-risk genes include *ACD* (also known as *TPP1*), *POT1*, and *TER2IP* coding for shelterin proteins forming a telomere-protecting complex [14]. Rare promoter mutations in telomerase (*TERT* gene) coding for an enzyme-maintaining telomere length have been found in familial melanoma [15]. An increased melanoma risk has been documented in carriers of germline mutations causing other cancer syndromes, including hereditary breast and ovarian cancer (*BRCA1/BRCA2*), retinoblastoma (*RBI*), or xeroderma pigmentosum (*XP*s) [16]. The low-risk group includes variants in genes coding for proteins involved in melanogenesis (*MC1R*, *MITF*, *OCA2*, *SLC45A2*, *TYR*, *TYRP1*) and other processes (*ASIP*, *CASP8*, *MTAP*, *OBFC1*), revealed dominantly by genome-wide association studies (GWAS) [17–19]. The identification of individuals carrying germline mutations in melanoma-predisposition genes enables their tailored surveillance with an early detection of melanoma and other associated tumors, and with genetic counselling for their relatives.

The Czech national cancer registry has recorded nearly doubled melanoma incidence during the past 25 years (from 7.55 cases per 100,000 inhabitants in 1994 to 13.47 in 2018), and melanoma has become the most rapidly growing malignant tumor among children and teenagers [20,21]. However, an analysis of genetic factors contributing to its development has not been performed in the Czech Republic to date.

Our study aimed primarily to characterize the spectrum and prevalence of germline mutations influencing melanoma risk. We have analyzed 264 high-risk Czech melanoma patients by panel next generation sequencing (NGS) targeting 217 genes that included eight high-to-moderate melanoma risk genes, 26 low melanoma risk genes, 37 other cancer-predisposing genes and 146 genes altered in melanoma but not associated with increased familial risk. Another task of our study was to identify melanoma patients who may benefit from genetic testing by comparing clinicopathological data from the carriers and non-carriers of germline mutations.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Population

We analyzed genomic DNA obtained from the peripheral blood of 264 unrelated melanoma patients indicated for a genetic analysis by medical geneticists based on individual or family criteria (Table 1). All patients were Caucasians of a Czech origin and provided written informed consent with the analysis approved by Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (No.: 56/15 Grant VES 2016 AZV 1.LFUK from 2015/06/18). The patients included a subgroup of 129 individuals (97 females/32 males) indicated at the General University Hospital in Prague and 135 individuals (96 females/39 males) indicated at the Masaryk Memorial Cancer Institute in Brno. Known clinicopathological characteristics are provided in Supplementary Table S1.

**Table 1.** Characteristic of subgroups combining personal cancer history (rows) and family cancer history (FCH; columns) criteria in 264 melanoma (M.) patients enrolled in the study.

| Criteria                              | Posit. FCH<br>incl. M. | Posit. FCH<br>incl. Other<br>Cancers | Negative<br>FCH | Unknown<br>FCH | Patients; N<br>(%) | Mean Age;<br>yrs (Range) |
|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------|----------------|--------------------|--------------------------|
| Multiple primary M.<br>& other cancer | 0                      | 4                                    | 0               | 2              | 6 (2.3)            | 45.0 (38–58)             |
| Multiple primary M.<br>& other cancer | 5                      | 8                                    | 3               | 1              | 17 (6.4)           | 37.3 (24–75)             |
| M. only, dg at < 25 yrs               | 9                      | 45                                   | 9               | 8              | 71 (26.9)          | 47.3 (14–83)             |
| M. only, dg at ≥ 25 yrs               | 5                      | 17                                   | 11              | 3              | 36 (13.6)          | 20.0 (9–24)              |
| M. only, dg at ≥ 25 yrs               | 41                     | 62                                   | 24              | 7              | 134 (50.8)         | 37.1 (25–69)             |
| Patients; N (% of all)                | 60 (22.7)              | 136 (51.5)                           | 47 (17.8)       | 21 (8.0)       | 264 (100)          | 37.7 (9–83)              |
| Mean age; yrs (range)                 | 38.9 (9–69)            | 37.8 (14–83)                         | 33.0 (15–66)    | 44.2 (14–75)   | -                  | -                        |

The control population included germline variants in targeted genes obtained from whole exome sequencing (WES) performed for various non-cancer conditions in 1479 unselected, adult, anonymized, ethnically matched controls (1014 males, mean age 55.5 years, range 18–88 years and 465 females, mean age 56.8 years, range 18–84). These anonymized genotypes of population-matched controls were provided by the National Center for Medical Genomics (<http://ncmg.cz>).

### 2.2. CZMELAC Sequence Capture Panel

The CZMELAC panel (CZech MELAnoma panel for Cancer predisposition) targeted 217 genes including (i) high-to-moderate and (ii) low melanoma risk genes, (iii) hereditary cancer syndrome genes with an uncertain melanoma risk, (iv) genes associated with “melanoma” in the Phenopedia database with at least two entries (assessed June 16, 2016; Table 2) [6,9,14,16,22–25].

The primary gene target for probe coverage was represented by all coding exons, including 10 bases from adjacent intronic regions, and it was designed using the NimbleDesign software (Roche) as

described previously [26,27]. The final CZMELAC panel target reached 563,471 bases. Because of the strict design conditions, some repeats and homologous regions were left untargeted (Supplementary Table S2).

**Table 2.** Analyzed genes in CZMELAC (CZech MELAnoma panel for Cancer predisposition) panel. Detailed information, including full names of analyzed genes, is provided in Supplementary Table S2.

|  |   |
|--|---|
| <b>High-to-moderate melanoma risk genes</b>                          | <i>ACD, BAP1, CDK4, CDKN2A, MITE, POT1, TERF2IP, TERT</i>   |
| <b>Low melanoma risk genes</b>                                       | <i>AGR3, ARNT, ASIP, CASP8, CCND1, CDKN2B, CLPTMIL, FTO, HERC2, IRF4, MC1R, MGMT, MTAP, MX2, OBFC1, OCA2, PARP1, PLA2G6, SETDB1, SLC24A4, SLC45A2, TERF1, TERF2, TINF2, TYR, TYRP1</i>  |
| <b>Hereditary cancer syndrome genes with uncertain melanoma risk</b> | <i>APC, ATM, BARD1, BMPRIA, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, FH, CHEK2, KIT, MET, MSH2, MSH3, MSH6, NBN, NF1, NF2, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, RET, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, STK11, TP53, VHL, WRN, WT1</i>  |
| <b>Genes with unknown impact on hereditary melanoma development</b>  | <i>ABLIM1, APEX1, ATRN, AURKA, BBC3, BLM, BRAF, BRMS1, CASP10, CBL, CCAR2, CCNH, CDK10, CDK7, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CEBPA, COX8A, CTLA4, CTNNB1, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1, CYP11A1, CYP1A2, CYP3A5, DAB2IP, DCAF4, DDB1, DDB2, EDNRB, EGF, EGFR, EIF1AX, EPCAM, ERBB2, ERBB4, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, EXOC2, EZH2, FANCC, FANCL, FANCM, FAS, FASLG, FGFR2, FGFR4, FLCN, FLT1, FDX3, GATA2, GATA4, GC, GNA11, GNAQ, GPC3, GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1, H2AFY, HRAS, IDH1, IDH2, IFIH1, IFNA1, IFNG, IL10, IL2RA, IL4, IL6, IL8, ING4, KAT6A, KIAA1967, KMT2A, KRAS, LRIG1, MAP2K1, MDM2, MLH1, MLH3, MMP1, MMP3, MUTYH, MYH7B, NCOA6, NFKB1, NFKBIE, NOD2, NOTCH3, NRAS, PAX5, PDGFRA, PIGU, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R4, PMAIP1, PMS1, POLH, POMC, PPM1D, PPP6C, PRF1, PTGS2, PTCH1, PTPN11, PTPN22, RAC1, RAD23A, RAD23B, RASEF, RECQL, RECQL4, RHOBTB2, RUNX1, SBDS, SF3B1, SH2B3, SLX4, SMARCB1, SNX31, STAG2, STK19, SUZ12, TACC1, TERC, TLR3, TRPM1, TSC1, TSC2, VDR, XAB2, XPA, XPC, XRCC1, XRCC3, ZNF365</i> |

### 2.3. Targeted NGS Analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood and 200–500 ng was used to prepare the NGS library. DNA was diluted in low TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) with 0.1 mM EDTA] and sheared by ultrasound (Covaris E220; Covaris, Chicago, IL, USA) to approximately 200 bp fragments checked using Agilent High Sensitivity DNA Kit on the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The subsequent end-repair, A-tailing, and ligation of adapters were performed using the KAPA HTP Library Preparation kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer with in-house prepared adapters. The processed fragments were size-selected (targeting 250–450 bp fragments) and primed with barcodes (identical to Illumina TruSeq HT index i7 and i5) by ligation-mediated PCR (LM-PCR), using in-house prepared double-indexing primers, to distinguish individual samples in subsequent pooling. The size and quality of fragments after the dual size selection and LM-PCR were controlled using Agilent High Sensitivity DNA Kit. Thirty individual samples (33 ng each) were pooled for enrichment and hybridized for 72 h with the CZMELAC panel probes (SeqCap EZ Choice Library; Roche, Basel, Switzerland). The enriched targeted sequences were amplified by post-capture PCR to create the final sequencing library. The enrichment was controlled using qPCR (NimbleGen SeqCap EZ Library SR User's Guide). The final 15 µM library was sequenced on MiSeq using MiSeq Reagent Kit v. 3 (150 cycles; Illumina, San Diego, CA, USA) targeting 100× mean coverage per sample.

### 2.4. Bioinformatics

The CZMELAC panel sequencing data generated in FASTQ files were analyzed as described previously [27]. Novoalign was used for mapping FASTQ files to hg19 reference. The variant-call format (VCF) files were processed by the GATK pipeline (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) from BAM files. The VCF files were annotated using SnpEff. We identified medium-size indels (insertions or duplications >35bp) using Pindel (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>) and copy number variations (CNV) using CNVkit (<https://pypi.python.org/pypi/CNVkit>), using the settings that we described in detail recently [26,27].

## 2.5. Variant Filtration and Prioritization

The primary list of annotated sequences was filtered in successive steps that included the elimination of: (i) low quality variants (quality < 150); (ii) out of bait variants (intergenic/deep intronic/UTR variants); (iii) intronic variants out of canonical splicing sites ( $\pm 1-2$  nucleotides in introns); (iv) variants with a minor allele frequency (MAF) > 0.003 in any of the ExAC/ESP6500/1000Genomes databases; (v) variants with MAF > 0.001 ( $n > 2$ ) in 1479 population-matched controls; (vi) synonymous variants; (vii) variants referred to as benign or likely benign (B/LB) in ClinVar; (viii) variants located in the repeat masking track from the UCSC Genome Browser; (ix) frameshift/stop-gain variants in the last exon. Filtration steps ii-ix were not applied if the found variants were referred to as pathogenic/likely pathogenic (P/LP) in ClinVar or “deleterious” in our functional analyses. The dataset of the control population was filtered identically. The final set of P/LP variants included only frameshift, stop-gain, frameshifting CNV, canonical splicing, ClinVar P/LP variants, and variants classified as “deleterious” by our functional analyses. All P/LP variants (variants with very strong and strong evidence of pathogenicity according to the ACMG guidelines [28] denoted throughout this text also as “mutations”) were in melanoma patients manually inspected in IGV and, when uncertain, confirmed by Sanger sequencing. The CNV P/LP variants were confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA; for *CHEK2*) or by quantitative PCR (for *SLC45A2* and *TRPM1*; Supplementary Figure S1).

## 2.6. Analysis of Splicing Alterations

All RNA samples obtained from peripheral blood or from expanded leukocytes (with/without nonsense-mediated decay inhibitor) were analyzed for splicing alterations using targeted RNA NGS with the CZMELAC panel, as described recently [29].

## 2.7. Statistical Analysis

The differences between the analyzed groups and subgroups were calculated by  $\chi^2$  or Fischer exact tests.

## 2.8. Functional Assays for Selected Germline Variants

### 2.8.1. CHEK2 Functional Analysis

A functional analysis of *CHEK2* VUS was performed as described recently [30]. Human RPE1-CHEK2-knock-out cells were transfected with wild-type or mutant EGFP-CHK2 and the level of KAP1-S473 phosphorylation was determined by immunofluorescence microscopy using ScanR station (Olympus, Tokyo, Japan).

### 2.8.2. POT1 Functional Analysis

*Cell lines and plasmids.* MCF-7 and HEK293 cells (generously provided by Rene Medema, NKI, Amsterdam) were grown in DMEM containing 6% FBS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (0.1 mg/mL). The cells were regularly tested for mycoplasma contamination using the MycoAlert kit (Lonza, Basel, Switzerland). A DNA fragment corresponding to human POT1 was PCR-amplified from pLPC-myc-hPOT1 (Addgene, ID:12387, Watertown, MA, USA) and inserted in frame into the XhoI/XmaI sites of pEGFP-C3. Plasmid pCDNA-3xFLAG-NLS-TPP1 was obtained from Addgene (ID: 53585, Watertown, MA, USA). Cells were transfected with plasmid DNA using polyethylenimine 40K (Polysciences, Warrington, PA, USA).

*Immunofluorescence microscopy.* To evaluate the localization of POT1 at telomeres, MCF-7 cells grown on coverslips were transfected with EGFP-POT1 or EGFP-POT1-P116L and analyzed by immunofluorescence microscopy. Cells were pre-extracted with 0.5% Triton-X 100 in ice-cold PBS for 5 min and fixed with 4% PFA for 15 min in room temperature (RT). Cells were blocked in 1% BSA for 30 min. Coverslips were incubated with TRF2 antibody (clone B-5, Santa Cruz, Dallas, TX, USA) for



2 h in RT, washed 3× in PBS, incubated with secondary antibody for 1h in RT. After washing in PBS and DAPI, coverslips were mounted with Vectashield and images were acquired using the confocal microscope Leica (Wetzlar, Germany) TCS SP8 equipped with a 63×/1.40 objective.

**Immuno-precipitation.** The ability of POT1 to interact with the shelterin complex was evaluated by immuno-precipitation. HEK293 cells were co-transfected with FLAG-TPP1 and EGFP, EGFP-POT1 or EGFP-POT1-P116L. Cells were extracted in IP buffer (50 mM Tris pH 8.0, 120 mM NaCl, 1% Tween-20, 0.1% NP-40, 1.0% glycerol, 2 mM EDTA, 3 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, protease inhibitors (Roche, Basel, Switzerland) and EtBr (50 µg/mL)) and sonicated 3 × 20 sec. Clarified cell extracts were incubated with GFP-Trap beads (Chromotek, Planegg, Germany) for 1 h. After washing 4× with IP buffer, bound proteins were eluted with Laemli buffer and separated by SDS-PAGE.

**Telomeric DNA binding assay.** POT1 binding to telomeric DNA was tested in vitro as described [31,32]. HEK293 cells transfected with EGFP, EGFP-POT1 or EGFP-POT1-P116L were extracted in IP buffer, sonicated and centrifuged for 20 min at 4 °C. Cell extracts were precleared with streptavidin sepharose beads for 1 h. Supernatants were then incubated with 2 µg of biotinylated telomeric DNA (ssG: biotin-TATATA(TTAGGG)<sub>8</sub>) or (tel5: biotin-GCAAGCTTTACCGATACA GC(TTAGGG)<sub>5</sub>) [31,32], or control DNA (ssC: biotin-TATATA(CCCTAA)<sub>8</sub>), for 12 h and Streptavidin beads were added for 1 h before washing with IP buffer. Bound proteins were eluted with Laemli buffer and analyzed by Western blotting (WB) using antibody against GFP (clone 7.1, Roche, Basel, Switzerland).

### 3. Results

#### 3.1. Germline Variants in Analyzed Genes

The overall mean coverage for all samples reached 116.7× with a good coverage uniformity across 217 analyzed genes (mean percent of target bases with coverage 20×, 50×, and 100× was 99.3%, 96.9%, and 79.2%, respectively). Panel NGS in 264 patients yielded 16,359 unique germline variants. Five hundred and sixteen of them remained after the application of variant filtration rules (described in the Methods section). Variants of uncertain significance (VUS) represented a majority (87%) of them and were excluded from further analyses as clinically inconclusive at the moment. The final 83 pathogenic/likely pathogenic (P/LP) germline variants (66 unique) in 71/264 (26.8%) melanoma patients were detected in 42/217 targeted genes (Supplementary Table S3) and included five copy number variants (CNV; two in *CHEK2* and *SLC45A2*, respectively, and one in *TRPM1*; Supplementary Figure S1). Using the identical prioritization procedure, we identified 225 P/LP variants in 204/1479 (13.8%) controls in 82/217 targeted genes, including two CNV (both in the *CHEK2* gene). Overall, 43/264 (16.3%) patients (Table 3) and 87/1479 (5.9%) controls carried a mutation in a gene previously associated with melanoma or other cancer.

**Table 3.** Germline P/LP (pathogenic/likely pathogenic) variants in melanoma patients.

| (a)                                | Gene: Coding Sequence (Protein) Change<br>- Concomitant Mutation                                   | Mel Site (Age) (b) | Other Tumors in<br>Proband (Age) | Family Cancer History<br>Tumor Type (N) (c)                           |
|------------------------------------|--|--------------------|----------------------------------|---|
| <i>High-to-moderate risk genes</i> |  |                    |                                  |   |
| F                                  | <i>CDKN2A</i> : c.16_20del5 (p.G6Qfs*7)  | TR (38)            | none                             | BC (1), Leu (1), Mel (1),<br>other 3 relatives with<br>unknown tumors |
| F                                  | <i>CDKN2A</i> : c.71G>C (p.R24P)   | TR (24)            | Mel (35)                         | CRC (1), Mel (1), UrC(1)  |
| F                                  | <i>CDKN2A</i> : c.71G>C (p.R24P)   | TR (28)            | Mel (38)                         | Mel (2)   |
| F                                  | <i>CDKN2A</i> : c.95_112del (p.L32_L37del)   | LE (28)            | GC (48)                          | BC (2), CRC(1), GC (1), LC<br>(1), Mel (2)                            |
| M                                  | <i>CDKN2A</i> : c.334C>G (p.R112G)   | HE (43)            | none                             | Mel (1), PaC(1)   |
| F                                  | <i>CDKN2A</i> : c.457+4_457+5delAG<br>(p.Y129Hfs*11)   | TR (29)            | Mel (34)                         | BT (1)  |
| F                                  | <i>POT1</i> : c.347C>T (p.P116L);<br>- <i>CHEK2</i> : c.909-2028_1095+330del5395<br>(p.M304Lfs*15) | UE (41)            | Mel (41,42,44);<br>BC (47)       | RC (1)  |
| F                                  | <i>POT1</i> : c.703-1G>C (p.V235Gfs*22)  | n.a. (37)          | TC (34);<br>BT (47)              | BC (1), CRC (1), LC(1), SgT<br>(1), TC (1)                            |
| M                                  | <i>ACD</i> : c.755delA (p.D255Afs*9)   | UE (39)            | none                             | negative  |

Table 3. Cont.

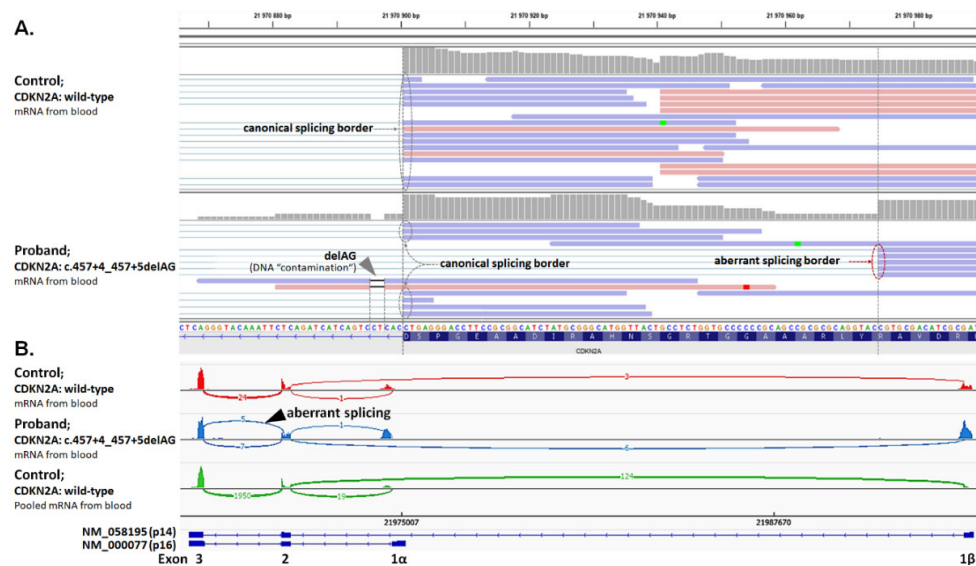
| (a)                                     | Gene: Coding Sequence (Protein) Change<br>- Concomitant Mutation                               | Mel Site (Age) <sup>(b)</sup> | Other Tumors in<br>Proband (Age) | Family Cancer History<br>Tumor Type (N) <sup>(c)</sup>                |
|---|--|-------------------------------|----------------------------------|---|
| <b>Low-risk genes</b>                   |  |                               |                                  |   |
| F                                       | OCA2: c.1211C>T (p.T404M);<br>- KAT6A: c.1138G>T (p.E380*)                                     | n.a. (29)                     | none                             | Mel(1)  |
| M                                       | OCA2: c.1327G>A (p.V443I)  | TR (15)                       | none                             | negative  |
| F                                       | OCA2: c.1327G>A (p.V443I)  | TR (43)                       | none                             | BC (3), CRC (3), PaC (1)  |
| F                                       | OCA2: c.1327G>A (p.V443I)  | LE (52)                       | Ly (38);<br>SkC (49)             | Leu (1), Unknown (1)  |
| M                                       | OCA2: c.2037G>C (p.W679C)  | n.a. (50)                     | none                             | negative  |
| M                                       | OCA2: c.2037G>C (p.W679C)  | n.a. (68)                     | SkC (68)                         | n.a.  |
| M                                       | TYRPI: c.1054_1057del4 (p.N353Vfs*31);<br>- TRPM1: Δe2-7 (p.?)<br>SLC45A2: Δe1-2 (p.?)         | TR (36)                       | none                             | Mel (2)   |
| M                                       | - GSTM3: c.393C>A (p.Y131*)  | EY (25)                       | none                             | n.a.  |
| F                                       | SLC45A2: Δe1-4 (p.?)   | TR (42)                       | BC (41)                          | PrC (1)   |
| M                                       | TYR: c.650G>A (p.R217Q)  | TR (37)                       | none                             | negative  |
| F                                       | TYR: c.1037-7T>A (p.?)<br>- FANCC: c.455dupA (p.N152Kfs*9)                                     | HE (66)                       | BC (52);<br>CRC (66)             | BC (2), HCC (1),  |
| F                                       | TINF2: c.796C>T (p.R266*)  | UE (48)                       | none                             | CRC (2), GbC (1), Mel (1),<br>PrC (2), RC (1), Sarcoma (1)            |
| <b>Hereditary cancer syndrome genes</b> |  |                               |                                  |   |
| F                                       | NBN: c.657_661del5 (p.K219Nfs*16)  | TR (24)                       | none                             | BC (1), BT (1), Mel (1)   |
| F                                       | NBN: c.657_661del5 (p.K219Nfs*16)  | EY (25)                       | none                             | negative  |
| M                                       | NBN: c.657_661del5 (p.K219Nfs*16)  | TR (37)                       | none                             | n.a.  |
| F                                       | NBN: c.657_661del5 (p.K219Nfs*16)  | HE (45)                       | Mel (68);<br>OC (56)             | n.a.  |
| F                                       | NBN: c.657_661del5 (p.K219Nfs*16)  | TR (65)                       | OC (67)                          | negative  |
| M                                       | NBN: c.1126delG (p.D376Ifs*2)  | n.a. (47)                     | none                             | LC (2), Mel (1),  |
| F                                       | NBN: c.1723G>T (p.E575*);<br>- NFKBIE: c.165_169dup5 (p.E57Afs*51)                             | LE (9)                        | none                             | Mel (1)   |
| M                                       | BRCA2: c.475G>A (p.V159M)  | UE (45)                       | RC (46)                          | HL (1)  |
| F                                       | BRCA2: c.1389_1390delAG (p.V464Gfs*3)  | LE (47)                       | BC (59,59)                       | GC (2)  |
| F                                       | BRCA2: c.5682C>G (p.Y1894*)  | n.a. (67)                     | BT (59);<br>BC (56)              | 3 sisters with<br>gynecological tumors, LC<br>(1), retinoblastoma (1) |
| M                                       | BRCA2: c.7007G>A (p.R2336H);<br>- FIH1: c.2464C>T (p.R822*)                                    | HE (22)                       | none                             | BT (1), PrC (2), TC (1)   |
| M                                       | BRCA2: c.8168_8172ins4 (p.Y2726Mfs*10);<br>- TYRPI: c.1254C>A (p.Y418*)                        | n.a. (40)                     | Mel (36);<br>NHL (38)            | LC (2)  |
| F                                       | BRCA1: c.68_69delAG (p.E23Vfs*17)  | TR (47)                       | UrC (56);<br>OC (57)             | n.a.  |
| F                                       | BRCA1: c.1687C>T (p.Q563*)   | EY (54)                       | BC (46)                          | OC (1)  |
| F                                       | BRCA1: c.4214delT (p.I1405Kfs*10);<br>- ATM: c.7630-2A>C (p.?)<br>- MUTHYH c.1187G>A (p.G396D) | LE (46)                       | OC (46);<br>BC (49)              | BC (3), OC (2)  |
| F                                       | BRCA1: c.5266dupC (p.Q1756Pfs*74)  | TR (53)                       | BC (54)                          | negative  |
| M                                       | CHEK2: c.909-2028_1095+330del5395<br>(p.M304Lfs*15)  | UE (28)                       | none                             | CRC(1), Ly (1), Mel (1),<br>MMT (1)                                   |
| M                                       | CHEK2: c.846+4_846+7del4<br>(p.D265-H282del)   | TR (38)                       | none                             | BC (1), CRC (2)   |
| F                                       | ATM: c.381delA (p.V128*)<br>- WRN: c.1105C>T (p.R369*)   | TR (41)                       | Mel (50)                         | BC (2), PaC (1)   |
| F                                       | ATM: c.5932G>T (p.E1978*)  | TR (35)                       | none                             | LC (1), UrC (1)   |
| F                                       | RAD51D: c.405+2T>C (p.?)<br>- CHEK2: c.917G>C (p.G306A)  | TR (26)                       | none                             | CC (1)  |
| F                                       | RBI: c.608-1G>T (p.?)  | TR (32)                       | BC (45)                          | GbC (1), LC (1)   |

<sup>(a)</sup> gender: M—male; F—female. <sup>(b)</sup> Melanoma localization: EY—eye; HE—head; LE—lower extremity; TR—trunk; UE—upper extremity. <sup>(c)</sup> BC—breast cancer; BT—brain tumor; CC—cervix cancer; CRC—colorectal cancer; GC—gastric cancer; GbC—gallbladder cancer; HCC—hepatocellular cancer; (n)HL—(non)Hodgkin lymphoma; LC—lung cancer; Leu—leukemia; Ly—lymphoma; Mel—melanoma; MMT—malignant mesenchymal tumor; OC—ovarian cancer; PaC—pancreatic cancer; PrC—prostate cancer; RC—renal cancer; SgT—salivary gland tumor; SkC—skin cancer; TC—thyroid cancer; UrC—urinary cancer. The reference numbers for genes listed in this table are provided in Supplementary Table S1.

### 3.1.1. Mutations in High-to-Moderate Melanoma Risk Genes

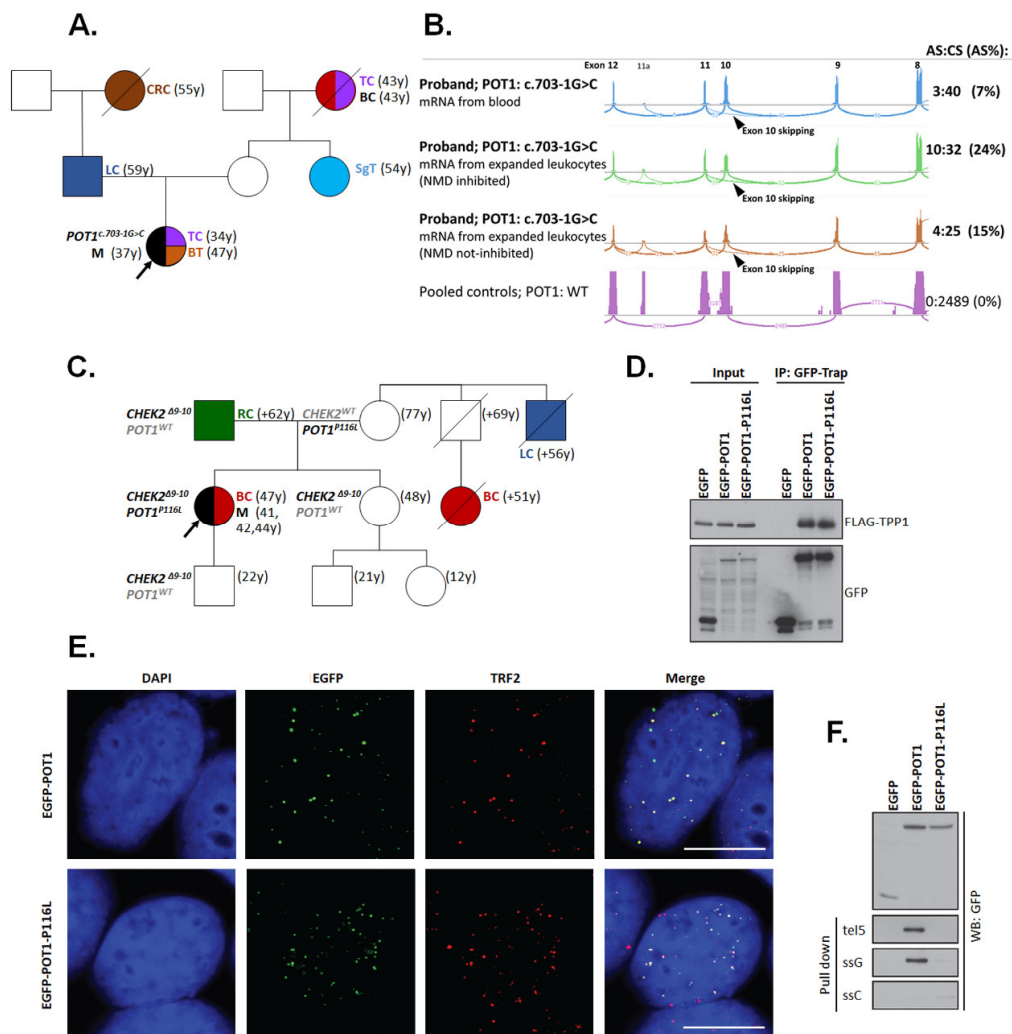
The highest prevalence in a subgroup of high-to-moderate melanoma risk genes was found in *CDKN2A* (NM\_000077). Disease-causing variants identified in six patients included ClinVar P/LP missense variants c.71G>C (p.R24P; in two patients) and c.334C>G (p.R112G), frameshift c.16\_20delGGGAG (p.G6Qfs\*7), in-frame c.95\_112del18 (p.L32\_L37del; shortening C-terminal part of

ankyrin 1 domain and adjacent  $\beta$ -hairpin loop), and the novel splicing alteration c.457+4\_457+5delAG, resulting in the activation of an aberrant splicing site (r.384\_457del74) and a frameshift (p.Y129Hfs\*11; Figure 1).



**Figure 1. Characterization of splicing aberrations in *CDKN2A*.** (A) NGS analysis of RNA isolated from blood lymphocytes identified aberrant splicing in a proband carrying the c.457+4\_457+5delAG variant (visible as two reads originated from DNA “contamination”; grey arrowhead). The variant causes the elimination of the canonical splice site and activation of the cryptic splice site within exon 2, resulting in the deletion of 74 nts (r.384\_457del74) and premature protein termination (p.Y129Hfs\*11). (B) The sashimi plot shows the presence of aberrant splicing in 5/12 reads in a proband’s sample, absent in 24 reads of a control with wild-type *CDKN2A*, and another 1950 reads of 100 pooled controls.

Two germline mutations were also found in *POT1* (NM\_015450). The c.703-1G>C mutation found in a proband with melanoma, dysplastic nevi, and thyroid cancer (Figure 2A) affected the canonical acceptor splice site of intron 10 resulting in exon 10 skipping at the mRNA level (r.703\_869del167) and a frameshift (p.V235Gfs\*22; Figure 2B). The rare missense variant c.347C>T changed the conserved amino acid p.P116L [33] in a patient with superficial spreading melanoma and breast cancer carrying also a germline deletion of 5395bp affecting exons 9 and 10 of the *CHEK2* gene (NM\_007194) (Figure 2C). To dissect the functional consequences of the *POT1* missense variant inherited from the maternal branch of the family, we performed a functional analysis. First, we immuno-precipitated wild-type EGFP-POT1 or mutant EGFP-POT1-P116L from transiently transfected cells and found that both variants bound comparable levels of TPP1 (alias ACD) protein which mediates the binding of POT1 to the shelterin complex (Figure 2D). Confocal microscopy revealed that EGFP-POT1-P116L colocalized with TRF2, suggesting that it can assemble into the shelterin complex and correctly localize to telomeres (Figure 2E). Since the p.P116L mutation resides within the oligosaccharide/oligonucleotide-binding (OB1) domain [34], we hypothesized that it may impair the binding of POT1 to ssDNA. Indeed, we found that only the wild-type POT1 (but not POT1-P116L) mutant bound to the biotinylated telomeric G strand efficiently (Figure 2F). We concluded that although the p.P116L isoform can localize to telomeric dsDNA through its interaction with ACD, it fails to bind telomeric ssDNA, which makes it a functionally deleterious mutation contributing to melanoma risk.



**Figure 2. Characterization of *POT1* germline variants.** (A) Family of a patient carrying c.703-1G>C. (B) The variant causes aberrant splicing (AS) with exon 10 skipping (r.703\_869del167; arrowhead; resulting in a frameshift at the protein level: p.V235Gfs\*22) that was never observed in an analysis of wild-type *POT1* samples (compared in blue and purple sashimi plots). However, AS mRNA is mostly subjected to nonsense-mediated decay (NMD). The number of NGS reads of non-degraded AS products in comparison with reads from canonical splicing (CS) products increased upon the cultivation of the patient’s lymphocytes with puromycin (an NMD inhibitor; compared as green and brown plots). (C) Segregation of germline mutations in a family with missense p.P116L *POT1* and CNV *CHEK2* (c.909-2028\_1095+330del5395) germline mutations. (D–F) Functional characterization was performed for the p.P116L *POT1* mutation. (D) *POT1*-P116L interacts with shelterin components. Extracts from cells transfected with FLAG-TPP1 (alias ACD) and EGFP, EGFP-*POT1* or EGFP-*POT1*-P116L were immuno-precipitated using GFP-Trap. Bound proteins were analyzed with EGFP and FLAG antibodies. (E) *POT1*-P116L is able to localize to telomeres. Cells transfected with EGFP-*POT1* or EGFP-*POT1*-P116L were fixed and stained with TRF2 antibody and analyzed using confocal microscopy. A representative image of a single plane is shown. Bar indicates 10 μm. (F) *POT1*-P116L mutant does not bind telomeric ssDNA. Extracts from cells transfected with EGFP, EGFP-*POT1* or EGFP-*POT1*-P116L were incubated with biotinylated oligonucleotides corresponding to telomeric ssDNA (tel5 and ssG) or control DNA (ssC) and pulled down with streptavidin beads. The bound proteins were analyzed by immunoblotting using anti-GFP antibody. Abbreviations: BC—breast cancer; BT—brain tumor; CRC—colorectal cancer; LC—lung cancer; M—melanoma; RC—renal cancer; SgT—salivary gland tumor; TC—thyroid cancer.

One patient carried the c.755delA (p.D255Afs\*9) mutation in *ACD* (NM\_001082486), another shelterin complex gene associated with high melanoma risk [35]. This mutation results in the truncation of the POT1-binding domain of the ACD protein. Another *ACD* mutation, c.617dupT (p.H206Qfs\*26), was the only P/LP variant from the category of high-to-moderate risk genes found in the control group. Although we did not find mutations in *TERT*, *BAP1*, or *CDK4*, germline mutations in the high-to-moderate risk category were present in 3.4% of patients (Table 4).

**Table 4.** Frequency of pathogenic/likely pathogenic (P/LP) germline variants in melanoma-susceptibility subgroups classified according to the risk of hereditary/familial melanoma risk. Eleven carriers of more than one P/LP variant were excluded from the analysis.

| Melanoma Susceptibility Class             | P/LP Variants; N (%) |               | OR (95%CI); <i>p</i>                    |
|---|----------------------|---------------|---|
|   | 264 Patients         | 1479 Controls |   |
| Multiple Mutation Carriers INCLUDED *     |                      |               |   |
| High-to-moderate risk melanoma genes      | 9 (3.4)              | 1 (0.1)       | 52.2 (6.6–413.1); $3.2 \times 10^{-7}$  |
| Low-risk melanoma genes                   | 12 (4.5)             | 35 (2.4)      | 1.9 (1.0–3.8); 0.06                     |
| Hereditary cancer syndrome genes          | 22 (8.3)             | 57 (3.9)      | 2.3 (1.4–3.8); 0.003                    |
| Genes with unknown familial melanoma risk | 28 (10.6)            | 132 (8.9)     | 1.2 (0.8–1.8); 0.4                      |
| Multiple Mutation Carriers EXCLUDED       |                      |               |   |
| High-to-moderate risk melanoma genes      | 8 (3.2)              | 1 (0.1)       | 48.1 (6.4–2116.9); $1.5 \times 10^{-6}$ |
| Low-risk melanoma genes                   | 8 (3.2)              | 35 (2.4)      | 1.3 (0.5–3.0); 0.51                     |
| Hereditary cancer syndrome genes          | 16 (6.3)             | 57 (3.9)      | 1.7 (0.9–3.0); 0.09                     |
| Genes with unknown familial melanoma risk | 28 (10.6)            | 132 (8.9)     | 1.2 (0.8–1.8); 0.4                      |

\* If carriers of concomitant mutations pertained to more than one risk group, they were assigned to a group with a higher risk as shown in Table 3: High-risk melanoma genes > Hereditary cancer syndrome genes > Low-risk melanoma genes > Genes with unknown familial melanoma risk.

### 3.1.2. Mutations in Low-Risk Melanoma Genes

The low-risk melanoma gene group revealed 12 carriers of mutations in 5 genes (Table 3; another *TYRP1* carrier also had a pathogenic *BRCA2* mutation). Hereditary melanoma risk was not increased in carriers of low-risk gene mutations (Table 4); however, we found a higher frequency in patients vs. controls for mutations in *TYRP1* (0.8 vs. 0%;  $p = 0.02$ ) and *OCA2* (2.3 vs. 0.5%; OR = 4.3; 95%CI 1.2–14.2;  $p = 0.01$ ); Supplementary Table S4.

### 3.1.3. Mutations in Genes Associated with Hereditary Cancer Syndromes

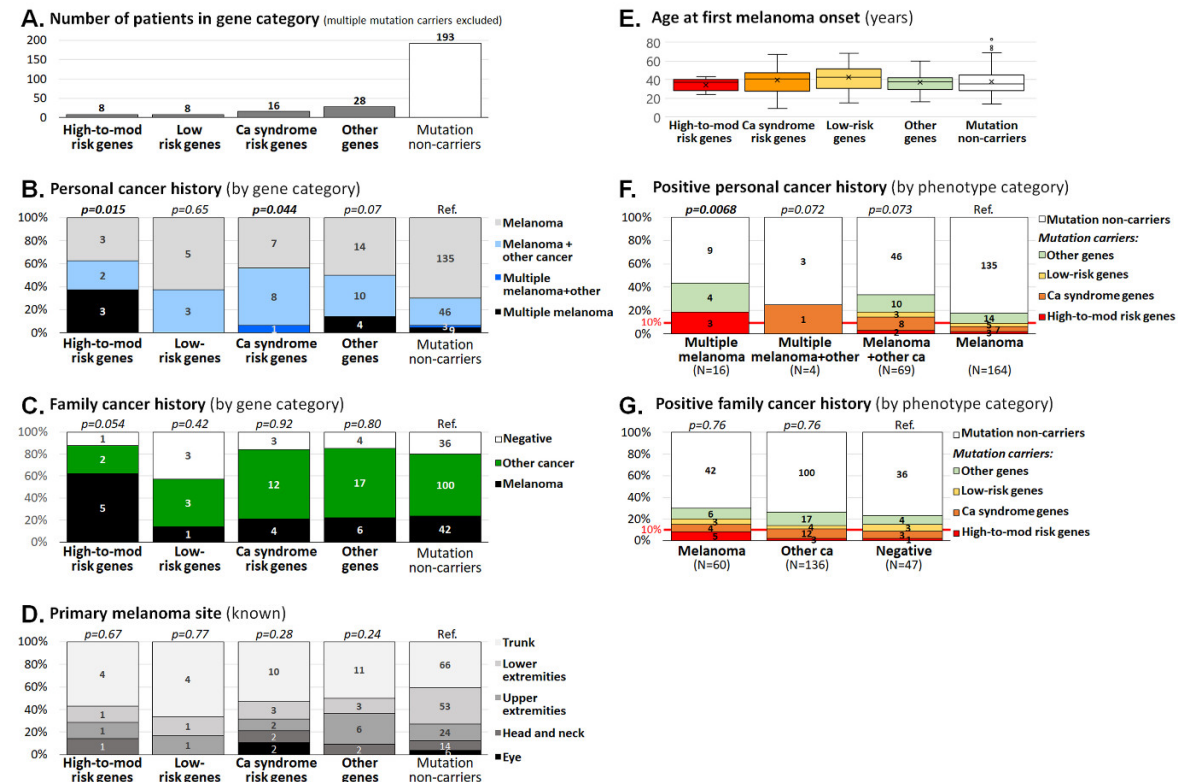
Altogether, 22/264 (8.3%) patients (Table 3) and 57/1479 controls (3.9%) carried a P/LP variant in genes associated with hereditary cancer syndromes. Overrepresentation of mutations in patients indicated an increased melanoma risk in carriers of mutations in hereditary cancer syndrome genes (OR = 2.27; 95%CI = 1.36–3.78;  $p = 0.003$ ); however, melanoma risk lost its significance after the exclusion of six patients carrying other concomitant mutations (Table 4). The mutations in *NBN* (OR = 10.0; 95%CI 2.5–47.0;  $p = 3.2 \times 10^{-4}$ ) and *BRCA2* (OR = 9.5; 95%CI 1.8–61.4;  $p = 0.003$ ) were the most frequent and significantly associated with hereditary melanoma. The frequencies of germline mutations in *CHEK2* gene (Supplementary Figures S1 and S2), *BRCA1*, and *MUTYH* were three times higher in patients over controls but marginally insignificant (all  $p = 0.051$ ; Supplementary Table S4).

### 3.1.4. Mutations in Other Genes with Unknown Familial Melanoma Risk

Mutations in 23 other genes with unknown familial melanoma risk were found in 28/264 (10.7%) patients and in a similar proportion of controls (132/1479; 8.9%). Neither the genes individually (Supplementary Table S5) nor the entire group of these genes (Table 4) were associated with a significant increase in melanoma risk.

### 3.2. Clinicopathological Characteristics of Melanoma Patients Carrying Germline Mutations

A total of 11 carriers of more than one P/LP variant were excluded from the comparison of clinicopathological characteristics performed in the remaining 60 carriers of P/LP variants and 193 non-carriers (Figure 3A).



**Figure 3.** Clinicopathological characteristics of melanoma patients based on the presence of germline mutations. Panel A overviews the number of melanoma patients in the gene categories displayed in panels B to E. The *p*-values express significance of the differences in distribution of variables between particular category of mutation carriers and non-carriers (considered as the reference). Panel F and G display proportion of mutation carriers in analyzed gene categories in individuals with positive personal cancer history (F); excluding 11 multiple mutation carriers) and in individuals with known positive family cancer history (G); excluding 21 individuals with unknown family cancer history). Differences in proportions of carriers and non-carriers (*p*-values) in particular subgroups were calculated in patients with positive personal history (F) against patients with melanoma only (Ref.) and in patients with positive family cancer history (G) against patients with negative cancer history (Ref.).

Classification according to the presence of mutations in melanoma susceptibility classes (shown in Table 4) revealed an increased frequency of patients with multiple melanoma or double primary tumors among the carriers of mutations in high-to-moderate melanoma risk genes (5/8; 63% patients) and in cancer syndrome genes (9/16; 56% of patients), respectively, when compared with non-carriers (58/193; 30% of patients; Figure 3B). On the other hand, no difference was found in the presence of melanoma or other cancers in patients' relatives, anatomical localization of melanoma, or age at melanoma onset (Figure 3C–E). The importance of personal cancer history for the potential to carry a mutation was confirmed when we calculated the proportion of patients with germline mutations in particular personal cancer history categories (Figure 3F). We noticed a significantly increased proportion of mutation carriers among patients with multiple melanoma (7/16; 44% of patients), compared with patients with single melanoma (29/164; 18% patients; *p* = 0.021). It is noteworthy that 14/89 (16%) patients with more than one tumor in personal history (i.e., patients with multiple melanoma, multiple

melanoma plus other cancer, and melanoma plus other cancer) carried a mutation in a clinically relevant gene (a high-to-moderate risk melanoma gene or a cancer syndrome gene), compared with 10/164 carriers (6%) among patients with single melanoma only ( $p = 0.023$ ). Thus, tumor multiplicity (not restricted to melanoma multiplicity) in probands increased the risk that they will carry a mutation (OR = 2.9; 95%CI 1.2–6.8). A positive family cancer history did not increase the risk of being a mutation carrier (Figure 3G); however, the prevalence of mutations in patients with a positive family cancer history (24/196 carriers, 12%) surpassed the 10% threshold justifying genetic testing in this group (in contrast to 4/47; 8.5% positively tested patients without family cancer history;  $p = 0.6$ ).

Altogether, 7/11 double mutation carriers (excluded from the analysis of clinicopathological data) carried at least one mutation in high-risk melanoma (*POT1/CHEK2*) or syndromic (*ATM/WRN*, *BRCA1*, *BRCA2* (2x), *CHEK2/RAD51D*, *NBN*) genes (Table 3). Melanoma or tumor multiplicity in personal cancer history was present in four (36%) of these patients and all of them had a positive family cancer history, indicating that personal or family cancer history positivity was also more frequent among double mutation carriers.

#### 4. Discussion

Our analysis demonstrated that 31/264 (11.7%) high-risk Czech melanoma patients (compared with 35/1479 or 2.3% controls) carried a mutation in some of the clinically important high-to-moderate melanoma risk genes (9 patients; 3.4%) or other cancer syndrome-associated genes (22 patients; 8.3%). As expected, *CDKN2A* was the most frequently mutated gene in the high-to-moderate risk gene group (in six analyzed patients; 2.3%). Four out of six *CDKN2A* mutation carriers developed >1 melanoma (3 patients) or other cancer (1 patient); all six carriers had a positive family cancer history and five of them had at least one relative with melanoma. The progressively rising probability of *CDKN2A* mutation prevalence with an increasing number of affected relatives with melanoma was described by Goldstein and colleagues in their study analyzing families of a European descent with at least three melanoma patients [36]. The frequency of *CDKN2A* mutation carriers rose from <40% for patients with three relatives with melanoma to >90% for those with more than six relatives with melanoma. In line with this observation, we have noticed three *CDKN2A* mutation carriers among 50 patients with one melanoma relative (6%) and two *CDKN2A* carriers among 10 patients with two melanoma relatives (20%). Goldstein et al. also observed an increased prevalence of pancreatic cancer patients in families with *CDKN2A* mutations (found in one p.R112G mutation carrier in our study). Germline mutations in high-risk melanoma susceptibility genes convey an increased risk of other cancers modifying genetic counselling in mutation carriers [24]. The spectrum of tumors in relatives diagnosed with cancer in the families of six *CDKN2A* mutation carriers included melanoma (7x), breast cancer (3x), rectal cancer (2x), and gastric, pancreatic, lung, and endometrial cancer, brain tumor, and leukemia (one each).

The three remaining patients with germline mutations in high-to-moderate melanoma risk genes carried a P/LP variant in genes coding for shelterin complex proteins. The protection of telomeres protein 1 (*POT1*) is essential for the control of telomere length by inhibiting telomerase [32]. In addition, *POT1* prevents hyper-resection at telomeric ends by inhibiting ATR [37]. The function of *POT1* at telomeres is determined by its interaction with the telomeric single-stranded 5'-TTAGGG-3' repeats and with the TRF1/2 subunits of the shelterin complex through TPP1 (ACD) protein. Interaction with telomeric G-strand DNA is mediated by the two N-terminal OB domains of *POT1*, whereas the C-terminal part of *POT1* interacts with TPP1 (ACD) [38]. Previous in silico and functional studies identified unstable binding and defective interaction with ssDNA for the p.R117C missense variant [33,39]. We found the adjacent p.P116L variant, described previously in a patient with sporadic cardiac sarcoma [33], in a patient with multiple melanoma and breast cancer, who also carried a large pathogenic *CHEK2* deletion. A functional analysis of the P116L isoform demonstrating its normal interaction with TPP1 (ACD) protein but impaired ssDNA binding led us to conclude that p.P116L is a functionally defective mutation. Germline *POT1* mutations have been initially described as increasing the risk of melanoma, but later studies indicate a broader cancer spectrum associated with these

mutations. Notably, *POT1* mutations have recently been associated with familial non-medullary thyroid cancer [40–42]. A duplicity of thyroid cancer with melanoma has been identified in a patient with a newly characterized splicing *POT1* mutation (thyroid cancer was present in the patient's untested mother's mother). In a single melanoma patient with a negative family cancer history, we identified a mutation in the *ACD* gene truncating the C-terminal proportion of the protein containing *POT1*- and *TINF2*-interacting domains required for the localization of *ACD* protein into the shelterin complex. Overall, high-to-moderate risk germline mutations affecting shelterin complex genes were found in three (1.1%) analyzed patients in our study. We also detected another shelterin gene truncating mutation affecting the *TINF2* gene that we included in the low-risk gene category; however, another *TINF2* truncation has recently been described to segregate with multiple thyroid cancer and melanoma in one family [43]. A higher prevalence of mutations in *ACD*, *TERF2IP*, and *POT1* was identified in 12/132 (9.1%) high-risk *CDKN2A/CDK4/TERT/BAP1* wild-type European and Australian patients with multiple melanoma ( $\geq 3$ ) [44]. A higher prevalence of germline mutations in *BAP1* (not identified in our patients) and *POT1* was also reported in a recent study by Pastorino and colleagues who identified seven carriers (2.6%) of mutations in each of these two genes among 273 Italian melanoma patients [45]. The enrollment of 22 melanoma patients with atypical Spitz nevi with relatives developing *BAP1*-related tumors can explain an increased prevalence of *BAP1* mutation carriers in this Italian study. Germline *BAP1* mutations were rarely identified in Czech patients so far, dominantly in probands with uveal melanoma or Spitz nevi [46,47].

The highest prevalence of germline mutations in our melanoma patients was found in the *NBN* gene (in 7/264 patients; 2.7%), coding for nibrin, a protein contributing to a MRN complex formation, sensing for DNA double strand breaks. We found the most frequent, Slavic founder germ-line hypomorphic variant c.657del5 in five patients [48]. Two of them also developed ovarian cancer, which was associated with *NBN* germline mutations in our population [49]. An increased melanoma prevalence among *NBN* c.657del5 mutation carriers was reported from Poland (with a frequency comparable to our patients) and southern Germany (with lower prevalence) [50–52]. Two of our melanoma patients (diagnosed with melanoma at 9 and 47 years, respectively; both with a melanoma-positive family cancer history) carried other rare *NBN* truncations. Gass and colleagues [53] reported a female carrier of the c.698\_701del4 germline mutation developing melanoma, squamous cell carcinoma, and breast cancer with a sister suffering from melanoma and other relatives affected by various cancer types, indicating that other *NBN* truncations increase melanoma risk. Analyses of *NBN* in other cancers demonstrated a highly variable population-specific prevalence of its germline mutations. Current NCCN guidelines report an association of *NBN* mutations with an increased breast cancer risk ([https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_bop.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf)), but further studies of unselected cancer patients with carefully population-matched controls are required to determine cancer risk associated with other cancer types, including melanoma. The prevalence of *NBN* mutations but also *BRCA2* mutations was significantly (nine-fold) higher in patients than in controls. P/LP variants in *BRCA1* and *CHEK2* were less enriched in patients over controls and statistically insignificant ( $p = 0.051$ ; Supplementary Table S5). The role of germline mutations in the breast-ovarian cancer predisposition genes *BRCA1* and *BRCA2* in the risk of familial melanoma development is still a matter of debate [54] and the exact melanoma risk increase (if any) in mutation carriers is uncertain. The same could be said of *CHEK2* as documented in a recent meta-analysis evaluating the association of germline *CHEK2* mutations with melanoma [55]. Large studies utilizing large gene panels to analyze patients with unselected melanoma or, even better, unselected cancer, will be required to dissect the risk of melanoma associated with hereditary cancer syndrome genes. However, we would like to emphasize that 4/9 *BRCA1* or *BRCA2* pathogenic mutation carriers and all *CHEK2* P/LP variant carriers would not be eligible for germline genetic testing according to the current guidelines, despite the fact that all other mutation carriers (except for one patient with the founder c.5266dupC *BRCA1* mutation) had a positive family cancer history and four also developed secondary tumors alongside solitary or



multiple melanoma (Table 3). The genetic counselling was offered to all carriers of mutations in high and moderate cancer risk genes.

An analysis of clinicopathological characteristics shows not only that multiple primary melanoma patients carry an increased risk of mutations in melanoma-predisposition genes, but also that the presence of melanoma and other non-melanoma cancer in the proband increased the potential to carry a clinically meaningful mutation in a melanoma predisposition or hereditary cancer syndrome gene.

We are aware of some limitations of our study. Most melanoma patients analyzed in our study were referred to the analysis by medical geneticists. This fact explains the enrichment of patient population in early-onset, multiple cancer, and family cancer-positive cases and incomplete clinicopathological data that lack phenotypic characteristics (eye and hair color, skin phototype according to Fitzpatrick, total number of nevi, the presence of clinically atypical nevi, freckle density, iris pigmentation), lifetime history of sunburns, and specific melanoma characteristics (histological subtype, Breslow thickness, clinical staging) in most of the patients. We are also aware that the gene selection in our CZMELAC panel would omit potentially clinically important gene(s). However, we would like to emphasize that we aimed to evaluate the importance of known melanoma/other cancer predisposition genes and candidate genes for clinical purposes in our melanoma patients rather than to identify genes that have not been associated with hereditary melanoma so far. Furthermore, only P/LP mutations were considered for subsequent statistical analyses. We excluded all VUS (except those in *CHEK2* and *POT1* that we functionally classified as deleterious) as currently clinically inconclusive, being aware that some of them may represent potentially important variants in both patient and control datasets. The presence of VUS substantially hampers the clinical utility of NGS diagnostics. Classifications of VUS frequently require demanding and time-consuming functional analyses that are beyond the expertise available in most of diagnostic laboratories. Therefore, VUS classifications, which are critically important for appropriate clinical interpretations of variants in cancer predisposition genes, are an opportunity for a collaborative effort of international consortia bringing together experts from various disciplines, who may provide substantial capacity for in vitro testing of VUS characterized by the co-operating laboratories.

In conclusion, we comprehensively assessed the prevalence of germline variants affecting currently known or candidate melanoma-predisposition genes in Czech melanoma patients and in the general population. Our analysis demonstrated that high-to-moderate risk genes, including genes coding for shelterin complex proteins, should be targeted in the multicancer panel NGS analysis. An analysis of clinicopathological characteristics indicated that patients eligible for such an analysis should not be restricted to multiple primary melanoma patients or patients with a positive familial melanoma cancer history, but they should also include melanoma patients with other primary cancer and melanoma patients with a positive family cancer history.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2227-9059/8/10/404/s1>, Table S1: Clinicopathological characteristics of analyzed melanoma patients, Table S2: List of 217 targeted genes in CZMELAC panel, Table S3: List of 83 P/LP variants found in melanoma patients (column H) and 225 P/LP variants identified in controls, Table S4: Frequency of pathogenic/likely pathogenic germline mutations in 89 out of 217 analyzed genes identified in 264 high-risk melanoma patients or in 1479 population-matched controls, Table S5: Found germline P/LP variants in genes with unknown association to familial melanoma, Figure S1: Intragenic deletions and duplications from technical control samples with known alterations and in samples from analyzed patients. Figure S2: New *CHEK2* germline variants (p.T133A and p.Y297D) identified in two melanoma patients were functionally classified as neutral in RPE1-CHEK2-KO cell-based assay.

**Author Contributions:** Conceptualization: Z.K., L.M.; methodology: Z.K., L.M., P.K.; software: P.Z., L.S., V.S.; validation: L.S., S.J., J.K., M.C., P.K.; formal analysis: L.S., S.J., R.S., M.V.; investigation: L.S., S.J., R.S., J.K., M.C., Z.V., M.J., J.S.; resources: E.M., M.V., O.K., P.D., V.S., L.F., L.M.; data curation: E.M., M.V., O.K., L.F.; writing—original draft preparation: L.S., Z.K.; writing—review and editing: all authors; visualization: Z.K., P.Z., P.K.; funding acquisition: P.D., L.M., Z.K., P.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Ministry of Health of the Czech Republic (grant numbers NV16-30954A, NV18-03-00024, NV19-03-00279), by Charles University projects (SVV 260516, PROGRES Q28/LF1) and by the Academy of Sciences of the Czech Republic project Strategie AV21, Qualitas. We would like to thank the National Center for Medical Genomics (LM2018132) for providing allelic frequencies in ethnically matched populations (project CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_046/0015515).

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

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

## References

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **2018**, *144*, 1941–1953. [[CrossRef](#)]
2. Bray, F.; Me, J.F.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Narayanan, D.L.; Saladi, R.N.; Fox, J.L. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* **2010**, *49*, 978–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Shain, A.H.; Bastian, B.C. From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 345–358. [[CrossRef](#)]
5. Mucci, L.A.; Hjelmberg, J.B.; Harris, J.R.; Czene, K.; Havelick, D.J.; Scheike, T.; Graff, R.E.; Holst, K.; Möller, S.; Unger, R.H.; et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA* **2016**, *315*, 68–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hawkes, J.E.; Truong, A.; Meyer, L.J. Genetic predisposition to melanoma. *Semin. Oncol.* **2016**, *43*, 591–597. [[CrossRef](#)]
7. Maggi, L.B.; Winkeler, C.L.; Miceli, A.P.; Apicelli, A.J.; Brady, S.N.; Kuchenreuther, M.J.; Weber, J.D. ARF tumor suppression in the nucleolus. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 831–839. [[CrossRef](#)]
8. Gruis, N.A.; Van Der Velden, P.A.; Sandkuijl, L.A.; Prins, D.E.; Weaver-Feldhaus, J.; Kamb, A.; Bergman, W.; Frants, R.R. Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat. Genet.* **1995**, *10*, 351–353. [[CrossRef](#)]
9. Hill, V.K.; Gartner, J.J.; Samuels, Y.; Goldstein, A.M. The Genetics of Melanoma: Recent Advances. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2013**, *14*, 257–279. [[CrossRef](#)]
10. Sargen, M.R.; Pfeiffer, R.; Yang, X.R.; Tucker, M.A.; Goldstein, A.M. Variation in Cutaneous Patterns of Melanomagenesis According to Germline CDKN2A/CDK4 Status in Melanoma-Prone Families. *J. Investig. Dermatol.* **2020**, *140*, 174–181.E3. [[CrossRef](#)]
11. Betti, M.; Aspesi, A.; Biasi, A.; Casalone, E.; Ferrante, D.; Ogliara, P.; Gironi, L.C.; Giorgione, R.; Farinelli, P.; Grosso, F.; et al. CDKN2A and BAP1 germline mutations predispose to melanoma and mesothelioma. *Cancer Lett.* **2016**, *378*, 120–130. [[CrossRef](#)]
12. Zuo, L.; Weger, J.; Yang, Q.; Goldstein, A.M.; Tucker, M.A.; Walker, G.J.; Hayward, N.; Dracopoli, N.C. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat. Genet.* **1996**, *12*, 97–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Carbone, M.; Yang, H.; Pass, H.I.; Krausz, T.; Testa, J.R.; Gaudino, G. BAP1 and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 153–159. [[CrossRef](#)]
14. Goldstein, A.M.; Xiao, Y.; Sampson, J.; Rotunno, M.; Bennett, H.; Wen, Y.; Jones, K.; Vogt, A.; Burdette, L.; Luo, W.; et al. Rare germline variants in known melanoma susceptibility genes in familial melanoma. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26*, 4886–4895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Harland, M.; Petljak, M.; Robles-Espinoza, C.D.; Ding, Z.; Gruis, N.A.; Van Doorn, R.; Pooley, K.A.; Dunning, A.M.; Aoude, L.G.; Wadt, K.A.W.; et al. Germline TERT promoter mutations are rare in familial melanoma. *Fam. Cancer* **2015**, *15*, 139–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Leachman, S.A.; Lucero, O.M.; Sampson, J.E.; Cassidy, P.; Bruno, W.; Queirolo, P.; Ghiorzo, P. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, *36*, 77–90. [[CrossRef](#)]
17. Chatzinasiou, F.; Lill, C.M.; Kypreou, K.; Stefanaki, I.; Nicolaou, V.; Spyrou, G.; Evangelou, E.; Roehr, J.T.; Kodala, E.; Katsambas, A.; et al. Comprehensive Field Synopsis and Systematic Meta-analyses of Genetic Association Studies in Cutaneous Melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103*, 1227–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. Law, M.H.; GenoMEL, consortium; Bishop, D.T.; Lee, J.E.; Brossard, M.; Martin, N.G.; Moses, E.K.; Song, F.; Barrett, J.H.; Kumar, R.; et al. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 987–995. [[CrossRef](#)]
19. Roberts, M.; Asgari, M.; Toland, A. Genome-wide association studies and polygenic risk scores for skin cancer: Clinically useful yet? *Br. J. Dermatol.* **2019**, *181*, 1146–1155. [[CrossRef](#)]
20. Dušek, L.; Mužík, J.; Malúšková, D.; Májek, O.; Pavlík, T.; Koptíková, J.; Melichar, B.; Buchler, T.; Fínek, J.; Cibula, D.; et al. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin. Onkol.* **2014**, *27*, 406–423. [[CrossRef](#)]
21. Krejci, D.; Zapletalova, M.; Svobodova, I.; Pehalova, L.; Muzik, J.; Klimes, D.; Snajdrova, L.; Bajciova, V.; Mudry, P.; Kodytkova, D.; et al. Epidemiological Trends for Childhood and Adolescent Cancers in the Period 1994–2016 in the Czech Republic. *Klin. Onkol.* **2019**, *32*, 10. [[CrossRef](#)]
22. Soura, E.; Eliades, P.J.; Shannon, K.; Stratigos, A.J.; Tsao, H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2016**, *74*, 395–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Soura, E.; Eliades, P.J.; Shannon, K.M.; Stratigos, A.J.; Tsao, H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2016**, *74*, 411–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Read, J.; Wadt, K.; Hayward, N.K. Melanoma genetics. *J. Med Genet.* **2015**, *53*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yu, W.; Clyne, M.; Khoury, M.J.; Gwinn, M. Phenopedia and Genopedia: Disease-centered and gene-centered views of the evolving knowledge of human genetic associations. *Bioinformatics* **2009**, *26*, 145–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lhota, F.; Zemankova, P.; Kleiblova, P.; Soukupova, J.; Vocka, M.; Stranecky, V.; Janatova, M.; Hartmannová, H.; Hodaňová, K.; Kmoch, S.; et al. Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1/BRCA2/PALB2 -negatively tested breast cancer patients. *Clin. Genet.* **2016**, *90*, 324–333. [[CrossRef](#)]
27. Soukupova, J.; Zemankova, P.; Lhotova, K.; Janatova, M.; Borecka, M.; Stolarova, L.; Lhota, F.; Foretova, L.; Machackova, E.; Stranecky, V.; et al. Validation of CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics* **2015**, *17*, 405–424. [[CrossRef](#)]
29. Walker, L.C.; Lattimore, V.L.; Kvist, A.; Kleiblova, P.; Zemankova, P.; De Jong, L.; Wiggins, G.A.R.; Hakkaart, C.; Cree, S.L.; Behar, R.; et al. Comprehensive Assessment of BARD1 Messenger Ribonucleic Acid Splicing with Implications for Variant Classification. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kleiblova, P.; Stolarova, L.; Krizova, K.; Lhota, F.; Hojny, J.; Zemankova, P.; Havranek, O.; Vocka, M.; Cerna, M.; Lhotova, K.; et al. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 1782–1797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zhou, J.; Chan, J.; Lambelé, M.; Yusufzai, T.; Stumpff, J.; Opresko, P.L.; Thali, M.; Wallace, S.S. NEIL3 Repairs Telomere Damage during S Phase to Secure Chromosome Segregation at Mitosis. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 2044–2056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Loayza, D.; De Lange, T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *4*, 1013–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Calvete, O.; Lázaro, C.; Domínguez, F.; Bougeard, G.; Kunze, K.; Braeuning, A.; Teule, A.; Lasa, A.; Cajal, T.R.Y.; Llort, G.; et al. The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *Eur. J. Hum. Genet.* **2017**, *25*, 1278–1281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lei, M.; Podell, E.R.; Cech, T.R. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1223–1229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Aoude, L.G.; Wadt, K.; Pritchard, A.L.; Hayward, N.K. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment. Cell Melanoma Res.* **2015**, *28*, 148–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Goldstein, A.M.; Chan, M.; Harland, M.; Hayward, N.K.; Demenais, F.; Bishop, D.T.; Azizi, E.; Bergman, W.; Bianchi-Scarrà, G.; Bruno, W.; et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: A GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J. Med Genet.* **2006**, *44*, 99–106. [[CrossRef](#)]

37. Kibe, T.; Zimmermann, M.; De Lange, T. TPP1 Blocks an ATR-Mediated Resection Mechanism at Telomeres. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 236–246. [[CrossRef](#)]
38. Kendellen, M.F.; Barrientos, K.S.; Counter, C.M. POT1 Association with TRF2 Regulates Telomere Length. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 5611–5619. [[CrossRef](#)]
39. Calvete, O.; Martínez, P.; García-Pavía, P.; Benitez-Buelga, C.; Paumard, B.; Fernandez, V.; Domínguez, F.; Salas, C.; Romero-Laorden, N.; García-Donás, J.; et al. A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-negative Li-Fraumeni-like families. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8383. [[CrossRef](#)]
40. Richard, M.A.; Lupo, P.J.; Morton, L.M.; Yasui, Y.A.; Sapkota, Y.A.; Arnold, M.A.; Aubert, G.; Neglia, J.P.; Turcotte, L.M.; Leisenring, W.M.; et al. Genetic variation in POT1 and risk of thyroid subsequent malignant neoplasm: A report from the Childhood Cancer Survivor Study. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0228887. [[CrossRef](#)]
41. Srivastava, A.; Miao, B.; Skopelitou, D.; Kumar, V.; Kumar, A.; Paramasivam, N.; Bonora, E.; Hemminki, K.; Försti, A.; Bandapalli, O.R. A Germline Mutation in the POT1 Gene Is a Candidate for Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 1441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wilson, T.L.-S.; Hattangady, N.; Lerario, A.M.; Williams, C.; Koeppe, E.; Quinonez, S.; Osborne, J.; Else, T.; Cha, K.B. A new POT1 germline mutation—Expanding the spectrum of POT1-associated cancers. *Fam. Cancer* **2017**, *53*, 1–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. He, H.; Li, W.; Comiskey, J.D.F.; Liyanarachchi, S.; Nieminen, T.T.; Wang, Y.; DeLap, M.K.E.; Brock, P.; De La Chapelle, A. A Truncating Germline Mutation of TIN2 in Individuals with Thyroid Cancer or Melanoma Results in Longer Telomeres. *Thyroid* **2020**, *30*, 204–213. [[CrossRef](#)]
44. Aoude, L.G.; Pritchard, A.L.; Robles-Espinoza, C.D.; Wadt, K.; Harland, M.; Choi, J.; Gartside, M.; Quesada, V.; A Johansson, P.; Palmer, J.M.; et al. Nonsense Mutations in the Shelterin Complex Genes ACD and TERF2IP in Familial Melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*, dju408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pastorino, L.; Andreotti, V.; Dalmaso, B.; Vanni, I.; Ciccicarese, G.; Mandalà, M.; Spadola, G.; Pizzichetta, M.A.; Ponti, G.; Tibiletti, M.G.; et al. Insights into Genetic Susceptibility to Melanoma by Gene Panel Testing: Potential Pathogenic Variants in ACD, ATM, BAP1, and POT1. *Cancers* **2020**, *12*, 1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Macháčková, E.; Házová, J.; Hrabincová, E.S.; Vašíčková, P.; Navrátilová, M.; Svoboda, M.; Foretová, L. Retrospective NGS Study in High-risk Hereditary Cancer Patients at Masaryk Memorial Cancer Institute. *Klin. Onkol.* **2016**, *29* (Suppl. S1), S35–S45. [[CrossRef](#)]
47. Foretová, L.; Navrátilová, M.; Svoboda, M.; Házová, J.; Vašíčková, P.; Sťahlová, E.H.; Fabian, P.; Schneiderová, M.; Macháčková, E.; Hrabincová, E.S. BAP1 Syndrome—Predisposition to Malignant Mesothelioma, Skin and Uveal Melanoma, Renal and Other Cancers. *Klin. Onkol.* **2019**, *32*, 118–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Fiévet, A.; Bellanger, D.; Zahed, L.; Burglen, L.; Derrien, A.; D’Enghien, C.D.; Lespinasse, J.; Parfait, B.; Pedespan, J.; Rieunier, G.; et al. DNA repair functional analyses of NBN hypomorphic variants associated with NBN-related infertility. *Hum. Mutat.* **2020**, *41*, 608–618. [[CrossRef](#)]
49. Lhotova, K.; Stolarova, L.; Zemankova, P.; Vočka, M.; Janatova, M.; Borecka, M.; Cerna, M.; Jelinkova, S.; Kral, J.; Volkova, Z.; et al. Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 956. [[CrossRef](#)]
50. Dębniak, T.; Górski, B.; Cybulski, C.; Jakubowska, A.; Kurzawski, G.; Lener, M.; Mierzejewski, M.; Masojć, B.; Mędrak, K.; Kładny, J.; et al. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in patients with malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res.* **2003**, *13*, 365–370. [[CrossRef](#)]
51. Steffen, J.; Varon, R.; Mosor, M.; Maneva, G.; Maurer, M.; Stumm, M.; Nowakowska, D.; Rubach, M.; Kosakowska, E.; Ruka, W.; et al. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in poland. *Int. J. Cancer* **2004**, *111*, 67–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Meyer, P.; Stapelmann, H.; Frank, B.; Varon, R.; Burwinkel, B.; Schmitt, C.; Boettger, M.B.; Klaes, R.; Sperling, K.; Hemminki, K.; et al. Molecular genetic analysis of NBS1 in German melanoma patients. *Melanoma Res.* **2007**, *17*, 109–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gass, J.M.; Jackson, J.; Macklin, S.; Blackburn, P.; Hines, S.; Atwal, P.S. A case of contralateral breast cancer and skin cancer associated with NBN heterozygous pathogenic variant c.698\_701delAACA. *Fam. Cancer* **2017**, *2013*, 551–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Adams, D.J.; Bishop, D.T.; Robles-Espinoza, C.D. Melanoma predisposition—A limited role for germline BRCA1 and BRCA2 variants. *Pigment. Cell Melanoma Res.* **2019**, *33*, 6–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Bui, A.-T.N.; Leboeuf, N.R.; Nambudiri, V.E. Skin cancer risk in CHEK2 mutation carriers. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2020**. [[CrossRef](#)]

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



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer

JAN KRAL<sup>1</sup>, SANDRA JELINKOVA<sup>1</sup>, PETRA ZEMANKOVA<sup>1,2\*</sup>, MICHAL VOCKA<sup>3,4\*</sup>, MARIANNA BORECKA<sup>1\*</sup>, LEONA CERNA<sup>5\*</sup>, MARTA CERNA<sup>1\*</sup>, LUKAS DOSTALEK<sup>6</sup>, PETRA DUSKOVA<sup>7\*</sup>, LENKA FORETOVA<sup>8\*</sup>, ONDREJ HAVRANEK<sup>4,9\*</sup>, KLARA HORACKOVA<sup>1</sup>, MILENA HOVHANNISYAN<sup>1</sup>, STEPAN CHVOJKA<sup>5\*</sup>, MARTA KALOUSOVA<sup>1</sup>, MARCELA KOSAROVA<sup>10\*</sup>, MONIKA KOUDOVA<sup>5\*</sup>, VERA KRUTILKOVA<sup>11\*</sup>, EVA MACHACKOVA<sup>8\*</sup>, PETR NEHASIL<sup>1,2,12\*</sup>, JAN NOVOTNY<sup>4\*</sup>, BARBORA OTAHALOVA<sup>1,13</sup>, ALENA PUCHMAJEROVA<sup>5\*</sup>, MARKETA SAFARIKOVA<sup>1</sup>, JIRI SLAMA<sup>6</sup>, VIKTOR STRANECKY<sup>12\*</sup>, IVAN SUBRT<sup>14\*</sup>, SPIROS TAVANDZIS<sup>11\*</sup>, MICHAL ZIKAN<sup>15</sup>, TOMAS ZIMA<sup>1</sup>, JANA SOUKUPOVA<sup>1\*</sup>, PETRA KLEIBLOVA<sup>1,4\*</sup>, ZDENEK KLEIBL<sup>1,2\*</sup> and MARKETA JANATOVA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague; <sup>2</sup>Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University; <sup>3</sup>Department of Oncology; <sup>4</sup>Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague 120 00; <sup>5</sup>Center for Medical Genetics and Reproductive Medicine, Gennet, Prague 170 00; <sup>6</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague 120 00; <sup>7</sup>Laboratory of Molecular Genetics, Hospital Ceske Budejovice, Ceske Budejovice 370 00; <sup>8</sup>Department of Cancer Epidemiology and Genetics, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno 656 53; <sup>9</sup>BIOCEV (Biotechnology and Biomedicine Center of The Czech Academy of Sciences and Charles University), First Faculty of Medicine, Charles University, Prague 252 50; <sup>10</sup>Department of Medical Genetics, Pronatal, Prague 140 00; <sup>11</sup>Department of Medical Genetics, AGEL Laboratories, AGEL Research and Training Institute, Novy Jicin 741 00; <sup>12</sup>Department of Paediatrics and Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague; <sup>13</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague 120 00; <sup>14</sup>Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University and University Hospital Pilsen, Pilsen 323 00; <sup>15</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Bulovka University Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University, Prague 180 00, Czech Republic

Received November 22, 2022; Accepted March 3, 2023

DOI: 10.3892/ol.2023.13802

*Correspondence to:* Dr Marketa Janatova, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Katerinska 1660/32, Prague 120 00, Czech Republic  
E-mail: mjana@lf1.cuni.cz

\*On behalf of CZEKANCA consortium

*Abbreviations:* ACMG, American College of Medical Genetics; BC, breast cancer; CI, confidence interval; CNV, copy number variation; CRC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer; EIN, endometrial intraepithelial neoplasia; FIGO, The International Federation of Gynecology and Obstetrics; GGT, germline genetic testing; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; MMR, mismatch repair; N, number; N.A., not available; NCCN, National Comprehensive Cancer Network; NGS, next generation sequencing; OC, ovarian cancer; OR, odds ratio; P/LP, pathogenic/likely pathogenic; PMC, population-matched controls; PV, pathogenic variant; VUS, variant of uncertain significance

*Key words:* uterine malignancies, EC, multigene panel testing, germline mutations

**Abstract.** Endometrial cancer (EC) is the most common gynecological malignancy in developed countries. The present study aimed to determine the frequency of germline pathogenic variants (PV) in patients with EC. In this multi-center retrospective cohort study, germline genetic testing (GGT) was performed in 527 patients with EC using a next generation sequencing panel targeting 226 genes, including 5 Lynch syndrome (LS) and 14 hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) predisposition genes, and 207 candidate predisposition genes. Gene-level risks were calculated using 1,662 population-matched controls (PMCs). Patients were sub-categorized to fulfill GGT criteria for LS, HBOC, both or none. A total of 60 patients (11.4%) carried PV in LS (5.1%) and HBOC (6.6%) predisposition genes, including two carriers of double PV. PV in LS genes conferred a significantly higher EC risk [odds ratio (OR), 22.4; 95% CI, 7.8-64.3;  $P=1.8 \times 10^{-17}$ ] than the most frequently altered HBOC genes *BRCA1* (OR, 3.9; 95% CI, 1.6-9.5;  $P=0.001$ ), *BRCA2* (OR, 7.4; 95% CI, 1.9-28.9;  $P=0.002$ ) and *CHEK2* (OR, 3.2; 95% CI, 1.0-9.9;  $P=0.04$ ). Furthermore, >6% of patients with EC not fulfilling LS or HBOC GGT indication criteria carried a PV in a clinically relevant gene. Carriers of PV in LS genes had a significantly lower age of EC onset than non-carriers

( $P=0.01$ ). Another 11.0% of patients carried PV in a candidate gene (the most frequent were *FANCA* and *MUTYH*); however, their individual frequencies did not differ from PMCs (except for aggregated frequency of loss-of-function variants in *POLE/POLD1*; OR, 10.44; 95% CI, 1.1-100.5;  $P=0.012$ ). The present study demonstrated the importance of GGT in patients with EC. The increased risk of EC of PV carriers in HBOC genes suggests that the diagnosis of EC should be included in the HBOC GGT criteria.

## Introduction

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

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

The risk of EC development is also affected by genetic factors. Germline pathogenic variants (PV) in known EC-predisposition genes are considered the most clinically important [reviewed in (5)]. Germline variants in EC patients were studied by several next generation sequencing (NGS) based studies, dominantly using limited gene panels (21-84 genes) (6-15). These studies reported variable prevalence of germline variants in EC patients ranging from 4.5 to 23%. Majority of hereditary EC cases are associated with Lynch syndrome (LS; also known as hereditary nonpolyposis colorectal cancer), which is caused by germline PV in mismatch repair genes (MMR; *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, and structural alterations of 3' end of *EPCAM*) (16). Guidelines for clinical follow-up of carriers of germline PV in LS genes include specific management of increased EC risk. Modest increase of EC risk has been suggested in *BRCA1* and *BRCA2* PV carriers (most notably the serous-like EC subtype), and other hereditary breast and ovarian cancer genes (HBOC; *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*) (17). Other noteworthy candidate EC-predisposition genes include e.g. *POLD1* and *POLE* (18). Germline missense PV affecting proofreading capabilities of *POLE/POLD1* are associated with increased EC risk as a part of polymerase proofreading-associated polyposis, but the importance of germline *POLD1/POLE* truncating variants remains rather elusive (18). Importantly, the genetic basis of most EC cases has not been explained yet as the diagnosis itself is not a criterion for germline genetic testing unless fulfilling LS criteria (5).

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

## Materials and methods

**Patients.** For this retrospective cohort study, we collected 527 patients with uterine malignancies diagnosed at nine Czech health care centers (General University Hospital in Prague, Masaryk Memorial Cancer Institute, AGEL Laboratories, Gennet, GHC Genetics, University Hospital Pilsen, Pronatal, Palacky University Olomouc) and the Bank of Clinical Samples (First Faculty of Medicine). The full list of all participating institutions is provided in the Table SI. Patients were enrolled between 2011-2021 and were Caucasians of the Czech origin. The clinicopathological characteristics (Table I) revealed that endometrial cancers (EC; 89.7%) were the dominant type of collected uterine malignancies, therefore the whole cohort of patients with uterine malignancies will be hereafter referred to as 'EC patients'. Deficient MMR, microsatellite instability and *MLH1* hypermethylation statuses were not available. We divided patients according to national indication criteria for germline genetic testing of LS and/or HBOC patients:

Breast cancer or ovarian cancer (C50/C56)-national indication criteria for germline genetic testing [HBOC criteria; cancer diagnoses (C##) correspond to the International Classification of Diseases 10; available at <https://icd.who.int/browse10/2019/en#/C00-C97>]. Personal history: i) patient is diagnosed with C50 <45 years or <50 years, if family history is unknown; ii) patient has bilateral C50 with the age of diagnosis of the first one <50 years and of both <60 years; iii) patient is diagnosed with triple negative C50 ≤60 years; iv) patient is a male diagnosed with C50; v) patient is diagnosed with either C56, C57 or C48; vi) patient has a duplicity of C50 and C25 regardless of age. Family history: i) patient and two relatives are diagnosed with C50; ii) patient and one relative are diagnosed with C50 <50 years or both C50 <60 years (patient included); iii) patient and a direct relative (parent, sibling, child, alternatively mother or father's sister) are diagnosed with either ovarian cancer, fallopian tube or primary peritoneal tumor, triple negative C50/medullar C50, male relative diagnosed with C50, pancreatic cancer, prostate cancer with Gleason score ≥7 or primary metastatic C61.

Colorectal cancer or EC-national indication criteria for germline genetic testing (LS criteria): i) Age of diagnosis <50 years; ii) proven microsatellite instability <60 years; iii) patient has a concurrent diagnosis linked to LS (colorectal cancer, stomach cancer, pancreatic cancer, ovarian cancer, small intestine cancer, ureter cancer, renal pelvis cancer, bile tract cancer, glioblastoma); iv) patient and one first degree relative have diagnoses linked to LS <50 years; v) patient and two second degree relatives have diagnoses linked to LS regardless of the age of diagnosis; and vi) patients with colorectal cancer and more than ten adenomas/polyps.

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

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

Table I. Clinicopathological characteristics of 527 patients with EC.

| Variables   | All patients with EC (N=527) | LS only (N=151) | HBOC only (N=16) | LS + HBOC (N=82) | Non-indicated (N=278) |
|---|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------------|
| Age at EC diagnosis                                   |                              |                 |                  |                  |                       |
| Mean, years   | 59.1                         | 50.8            | 59.0             | 51.3             | 65.8                  |
| Median, years   | 60.5                         | 47.8            | 57.0             | 49.0             | 65.3                  |
| Range, years  | 24-92                        | 24-91           | 51-73            | 29-82            | 50-92                 |
| <50 years, n (%)                                      | 120 (23.2)                   | 79 (53.4)       | 0                | 41 (51.3)        | 0                     |
| ≥50 years, n (%)                                      | 397 (76.8)                   | 69 (46.6)       | 15 (100.0)       | 39 (48.8)        | 274 (100.0)           |
| N.A., n   | 10                           | 3               | 1                | 2                | 4                     |
| Histology of uterine malignances, n (%)               |                              |                 |                  |                  |                       |
| Endometrial carcinoma                                 | 349 (89.7)                   | 76 (85.4)       | 8 (72.7)         | 48 (100.0)       | 217 (90.0)            |
| Endometrioid adenocarcinoma                           | 284 (73.0)                   | 65 (73.0)       | 7 (63.6)         | 44 (91.7)        | 168 (69.7)            |
| Serous  | 35 (9.0)                     | 4 (4.5)         | 1 (9.1)          | 3 (6.3)          | 27 (11.2)             |
| Clear cell  | 7 (1.8)                      | 2 (2.2)         | 0                | 0                | 5 (2.1)               |
| Undifferentiated                                      | 3 (0.8)                      | 0               | 0                | 0                | 3 (1.2)               |
| Mixed (endometrioid/serous)                           | 3 (0.8)                      | 0               | 0                | 0                | 3 (1.2)               |
| Mixed (endometrioid/serous/<br>clear cell)            | 1 (0.3)                      | 1 (1.1)         | 0                | 0                | 0                     |
| Mixed (endometrioid/clear cell)                       | 4 (1.0)                      | 3 (3.4)         | 0                | 0                | 1 (0.4)               |
| EIN   | 8 (2.1)                      | 1 (1.1)         | 0                | 1 (2.1)          | 6 (2.5)               |
| Unspecified   | 4 (1.0)                      | 0               | 0                | 0                | 4 (1.7)               |
| Sarcoma   | 40 (10.3)                    | 13 (14.6)       | 3 (27.3)         | 0                | 24 (10.0)             |
| Leiomyosarcoma  | 32 (8.2)                     | 9 (10.1)        | 2 (18.2)         | 0                | 21 (8.7)              |
| Undifferentiated                                      | 2 (0.5)                      | 0               | 0                | 0                | 2 (0.8)               |
| Endometrial stromal sarcoma                           | 3 (0.8)                      | 2 (2.2)         | 0                | 0                | 1 (0.4)               |
| Unspecified   | 3 (0.8)                      | 2 (2.2)         | 1 (9.1)          | 0                | 0                     |
| Unknown malignant tumor of<br>corpus uteri            | 138                          | 62              | 5                | 34               | 37                    |
| FIGO grade, n (%)                                     |                              |                 |                  |                  |                       |
| 1   | 123 (35.9)                   | 35 (48.6)       | 4 (40.0)         | 16 (45.7)        | 68 (30.1)             |
| 2   | 100 (29.2)                   | 15 (20.8)       | 3 (30.0)         | 12 (34.3)        | 70 (31.0)             |
| 3   | 120 (35.0)                   | 22 (30.6)       | 3 (30.0)         | 7 (20.0)         | 88 (38.9)             |
| N.A.  | 184                          | 79              | 6                | 47               | 52                    |
| FIGO stage, n (%)                                     |                              |                 |                  |                  |                       |
| 0   | 8 (2.8)                      | 1 (2.1)         | 0                | 1 (4.2)          | 6 (2.8)               |
| I   | 176 (60.9)                   | 33 (68.8)       | 4 (66.7)         | 17 (70.8)        | 122 (57.8)            |
| II  | 38 (13.1)                    | 5 (10.4)        | 1 (16.7)         | 2 (8.3)          | 30 (14.2)             |
| III   | 48 (16.6)                    | 8 (16.7)        | 1 (16.7)         | 2 (8.3)          | 37 (17.5)             |
| IV  | 19 (6.6)                     | 1 (2.1)         | 0                | 2 (8.3)          | 16 (7.6)              |
| N.A.  | 238                          | 103             | 10               | 58               | 67                    |
| Multiple primary tumors in<br>personal history, n (%) |                              |                 |                  |                  |                       |
| Present   | 214 (40.6)                   | 69 (45.7)       | 16 (100.0)       | 82 (100.0)       | 47 (16.9)             |
| Absent  | 313 (59.4)                   | 82 (54.3)       | 0                | 0                | 231 (83.1)            |
| Multiple primary tumors in<br>personal history, n (%) |                              |                 |                  |                  |                       |
| CRC   | 31 (5.9)                     | 31 (20.5)       | 0                | 0                | 0                     |
| OC  | 59 (11.2)                    | 0               | 1 (6.3)          | 58 (70.7)        | 0                     |
| BC  | 80 (15.2)                    | 14 (9.3)        | 15 (93.8)        | 13 (15.9)        | 38 (13.7)             |
| Triple primary EC+<br>(BC/OC/CRC)                     | 13 (2.5)                     | 2 (1.3)         | 0                | 11 (13.4)        | 0                     |
| Other   | 31 (5.9)                     | 22 (14.6)       | 0                | 0                | 9 (3.2)               |
| None  | 313 (59.4)                   | 82 (54.3)       | 0                | 0                | 231 (83.1)            |



Table I. Continued.

| Variables  | All patients with EC (N=527) | LS only (N=151) | HBOC only (N=16) | LS + HBOC (N=82) | Non-indicated (N=278) |
|--|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------------|
| Family cancer history (first/second degree), n (%) |                              |                 |                  |                  |                       |
| Positive   | 353 (69.8)                   | 120 (81.6)      | 13 (100.0)       | 56 (73.7)        | 164 (60.7)            |
| Negative   | 153 (30.2)                   | 27 (18.4)       | 0                | 20 (26.3)        | 106 (39.3)            |
| Unknown  | 21                           | 4               | 3                | 6                | 8                     |
| Tumors in family history, n (%)                    |                              |                 |                  |                  |                       |
| EC   | 35 (6.9)                     | 14 (9.5)        | 1 (7.7)          | 6 (7.9)          | 14 (5.2)              |
| CRC  | 88 (17.4)                    | 39 (26.5)       | 4 (30.8)         | 15 (19.7)        | 30 (11.1)             |
| OC   | 15 (3.0)                     | 7 (4.8)         | 1 (7.7)          | 5 (6.6)          | 2 (0.7)               |
| BC   | 60 (11.9)                    | 14 (9.5)        | 3 (23.1)         | 9 (11.8)         | 34 (12.6)             |
| Multiple (EC/OC/CRC)                               | 10 (2.0)                     | 10 (6.8)        | 0                | 0                | 0                     |
| Other  | 145 (28.7)                   | 36 (24.5)       | 4 (30.8)         | 21 (27.6)        | 84 (31.1)             |
| None   | 153 (30.2)                   | 27 (18.4)       | 0                | 20 (26.3)        | 106 (39.3)            |
| Unknown  | 21                           | 4               | 3                | 6                | 8                     |

Percentages were calculated from the overall number of patients with known characteristics. BC, breast cancer; CRC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer; EIN, endometrial intraepithelial neoplasia; FIGO, The International Federation of Gynecology and Obstetrics; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; N, number; N.A., not available; OC, ovarian cancer.

Two sets of population-matched controls (PMC) were used for comparisons with analyzed EC patients. First, used as a reference for genetic variant prioritization, included 777 non-cancer volunteers aged >60 years that were analyzed identically with EC patients as described previously (19). Second group, used in case-control analyses, included 1662 PMC analyzed as described previously (20). Briefly, the unselected controls (1,170 males and 492 females; median age 57 years, range 18-88 years) were unrelated individuals analyzed by whole-exome sequencing by National Center for Medical Genomics (<https://ncmg.cz/>) for various noncancer conditions.

*Genetic testing using panel NGS.* Genomic DNA was isolated from peripheral blood collected at the time of enrollment in each respective center. DNA samples were analyzed by NGS using a custom-designed CZECA NCA panel as described previously (21) with minor modifications reflecting recent technological updates. These modifications included a new probe synthesis HyperDesign (Roche) improving target coverage for all 226 genes (the sequence capture panel development is shown in detail on the panel web page: <http://www.czecanca.cz/eng/panel.html>, and full list of genes targeted in this project is described in Table SII). Further modifications included usage of cheaper and faster enzymatic fragmentation replacing ultrasound DNA fragmentation, preparation of DNA libraries using recently introduced KAPA HyperPlus Library Preparation kit (Roche; according to the manufacturer's instruction) and Illumina NextSeq500 sequencing. Resulting NGS data were processed by an in-house bioinformatics pipeline as we described previously (21). Briefly, SAM files were generated from FASTQ using NovoAlign v2.08.03 (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/>) and transformed into BAM by

Picard tools v1.129 (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). The Genome Analysis Toolkit v3.8.1 (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) (22) was used to prepare variant-call format, annotated by SnpEff v4.3 (<http://pcingola.github.io/SnpEff/>). Identification of medium size indels was performed by Pindel v0.2.5a7 (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>) and copy number variations (CNV) were detected using CNV kit v0.7.4 (<https://pypi.python.org/pypi/CNVkit>).

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

*Variant prioritization.* Genetic variants found in patients were filtered, excluding variants: i) with low sequencing quality ( $q < 150$ ); ii) with a high minor allele frequency (MAF >0.001) in population databases (gnomAD <https://gnomad.broadinstitute.org/>, Exome Sequencing Project <https://evs.gs.washington.edu/EVS/>, 1000 Genomes Project <https://www.internationalgenome.org/>) (23-25) unless classified as pathogenic/likely pathogenic (P/LP) in the ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (26); iii) present with frequency higher than 0.5% in a group of 777 PMC, except for variants with P/LP ClinVar classification; iv) in untranslated region, intronic outside of consensus splice sites, synonymous and

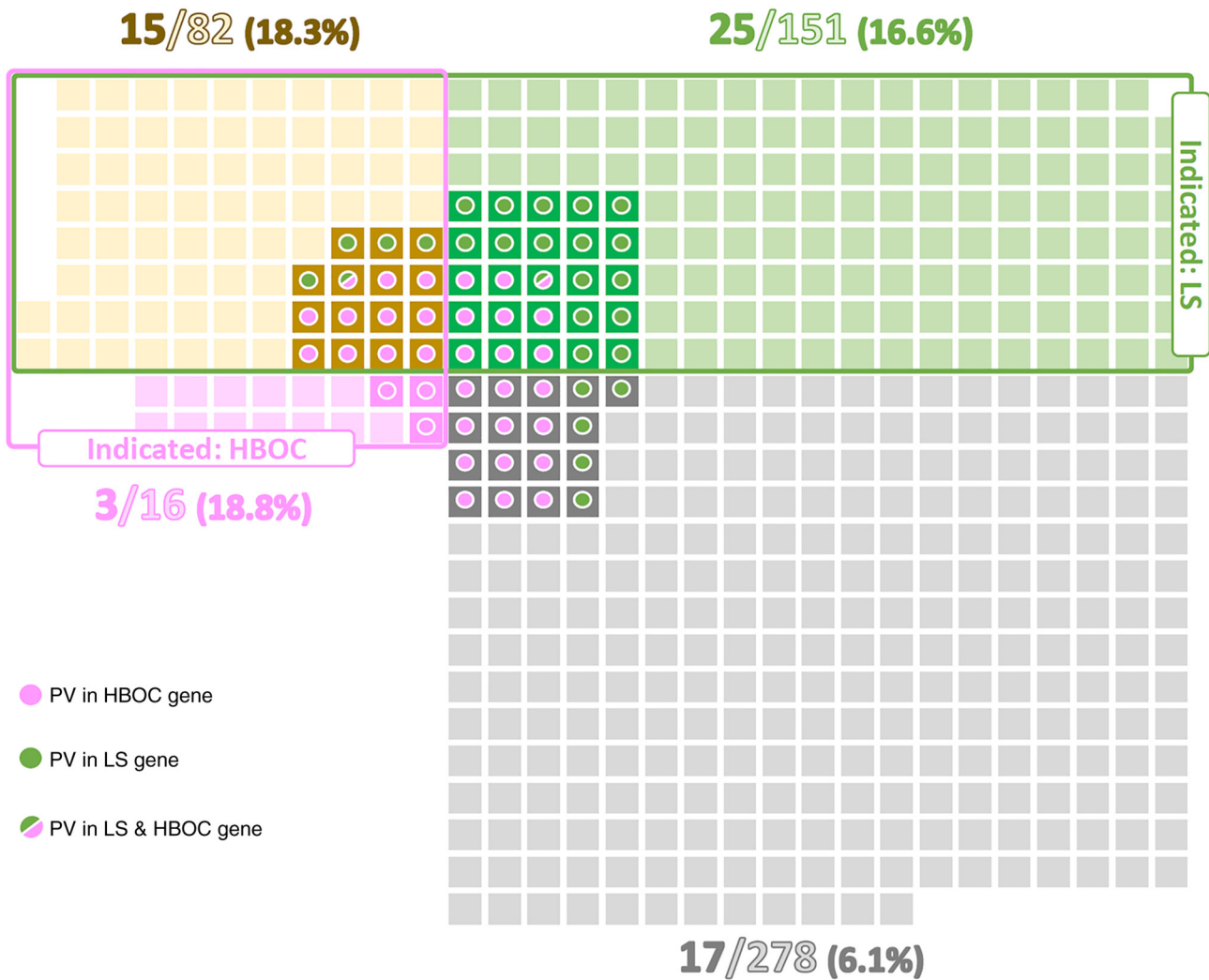


Figure 1. Distribution of PV carriers in patient subgroups based on criteria for germline genetic testing for LS and HBOC. Squares colored in green, pink, yellow and grey represent individual patients fulfilling criteria for LS only, criteria for HBOC only, both criteria or not fulfilling any criteria,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

insertion/deletions not resulting in a frameshift unless classified as pathogenic/likely pathogenic (P/LP) in the ClinVar database; v) classified as benign/likely benign in ClinVar with at least two-star rating; vi) low risk variants in *BRCA2* (c.9976A>T; p.Lys3326Ter) and in *CHEK2* (c.470T>C; p.Ile157Thr).

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

**Statistical analysis.** The frequencies of PV in EC patients were compared with the frequencies of PV in a group of 1662 unselected PMC. Odds ratios (OR) with 95% confidence

intervals (CI) were calculated for EC patients carrying found germline PV using 2x2 contingency table. The  $\chi^2$  or Fisher's exact tests were used for the calculation of P-values (considered significant when  $P < 0.05$ ). Differences in age at diagnosis were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's test. Statistical analysis was performed using the R language v4.1.

**Results**

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

*Germline PV in EC-predisposition genes.* PV were found in 12 (out of 19 tested) EC-predisposition genes (Table II). Frequency of these variants was more than four-times higher in

Table II. Frequencies of germline PV in 19 ec-predisposition genes.

| Gene group  | Germline PV               | Indication for germline genetic testing |                    |                        |                              |                         | All patients with EC, n (%) (N=527) | PMC, n (%) (N=1662)  | All patients with EC vs. PMC |  |
|-------------|---------------------------|---|--------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------------------|--|
|             |                           | LS, n (%) (N=151)                       | HBOC, n (%) (N=16) | LS+ HBOC, n (%) (N=82) | Non-indicated, n (%) (N=278) | OR (95% CI)             |                                     |                      | P-value                      |  |
| LS          | <i>MLH1</i> <sup>a</sup>  | 3 (2.0)                                 | 0                  | 2 <sup>a</sup> (2.4)   | 1 (0.4)                      | 6 <sup>a</sup> (1.1)    | 1 (0.1)                             | 19.1 (2.3-159.1)     | 1.3x10 <sup>-4</sup>         |  |
|             | <i>MSH2</i> <sup>b</sup>  | 6 <sup>b</sup> (4.0)                    | 0                  | 2 (2.4)                | 0                            | 8 <sup>b</sup> (1.5)    | 0                                   | N.A.                 |                              |  |
|             | <i>MSH6</i>               | 8 (5.3)                                 | 0                  | 1 (1.2)                | 4 (1.4)                      | 13 (2.4)                | 0                                   | N.A.                 |                              |  |
|             | <i>PMS2</i>               | 0                                       | 0                  | 0                      | 0                            | 0                       | 3 (0.2)                             | N.A.                 |                              |  |
|             | <i>EPCAM</i>              | 0                                       | 0                  | 0                      | 0                            | 0                       | 0                                   | N.A.                 |                              |  |
|             | All LS genes              | 17 (11.3)                               | 0                  | 5 (6.1)                | 5 (1.8)                      | 27 (5.1)                | 4 (0.2)                             | 22.4 (7.8-64.3)      | 1.8x10 <sup>-17</sup>        |  |
| HBOC        | <i>ATM</i> <sup>b</sup>   | 1 <sup>b</sup> (0.7)                    | 0                  | 1 (1.2)                | 3 (1.1)                      | 5 <sup>b</sup> (1.0)    | 7 (0.4)                             | 2.3 (0.2-7.2)        | 0.2                          |  |
|             | <i>BARD1</i>              | 0                                       | 0                  | 1 (1.2)                | 0                            | 1 (0.2)                 | 0                                   | N.A.                 |                              |  |
|             | <i>BRCA1</i> <sup>a</sup> | 2 (1.3)                                 | 2 (12.5)           | 6 <sup>a</sup> (7.3)   | 1 (0.4)                      | 11 <sup>a</sup> (2.1)   | 9 (0.5)                             | 3.9 (1.6-9.5)        | 1.0x10 <sup>-3</sup>         |  |
|             | <i>BRCA2</i>              | 1 (0.7)                                 | 1 (6.3)            | 0                      | 5 (1.8)                      | 7 (1.3)                 | 3 (0.2)                             | 7.4 (1.9-28.9)       | 2.0x10 <sup>-3</sup>         |  |
|             | <i>BRIP1</i>              | 0                                       | 0                  | 0                      | 1 (0.4)                      | 1 (0.2)                 | 3 (0.2)                             | 1.1 (0.1-10.1)       | >0.9                         |  |
|             | <i>CDH1</i>               | 0                                       | 0                  | 0                      | 0                            | 0                       | 0                                   | N.A.                 |                              |  |
|             | <i>CHEK2</i>              | 3 (2.0)                                 | 0                  | 1 (1.2)                | 2 (0.7)                      | 6 (1.1)                 | 6 (0.4)                             | 3.2 (1.0-9.9)        | 4.0x10 <sup>-2</sup>         |  |
|             | <i>NF1</i>                | 0                                       | 0                  | 0                      | 0                            | 0                       | 1 (0.1)                             | N.A.                 |                              |  |
|             | <i>PALB2</i>              | 1 (0.7)                                 | 0                  | 0                      | 0                            | 1 (0.2)                 | 8 (0.5)                             | 0.4 (0.1-3.1)        | 0.4                          |  |
|             | <i>PTEN</i>               | 1 (0.7)                                 | 0                  | 0                      | 0                            | 1 (0.2)                 | 1 (0.1)                             | 3.2 (0.2-50.5)       | 0.4                          |  |
|             | <i>RAD51C</i>             | 0                                       | 0                  | 2 (2.4)                | 0                            | 2 (0.4)                 | 2 (0.1)                             | 3.2 (0.4-22.5)       | 0.2                          |  |
|             | <i>RAD51D</i>             | 0                                       | 0                  | 0                      | 0                            | 0                       | 0                                   | N.A.                 |                              |  |
|             | <i>STK11</i>              | 0                                       | 0                  | 0                      | 0                            | 0                       | 0                                   | N.A.                 |                              |  |
| <i>TP53</i> | 0                         | 0                                       | 0                  | 0                      | 0                            | 2 (0.1)                 | N.A.                                |                      |                              |  |
| All HBOC    | 9 (6.0)                   | 3 (18.8)                                | 11 (13.4)          | 12 (4.3)               | 35 (6.6)                     | 42 (2.5)                | 2.7 (1.7-4.3)                       | 7.9x10 <sup>-5</sup> |                              |  |
| All genes   | All PV                    | 26                                      | 3                  | 16                     | 17                           | 62                      | 46                                  |                      |                              |  |
| All genes   | All carriers              | 25 <sup>b</sup> (16.6)                  | 3 (18.8)           | 15 <sup>a</sup> (18.3) | 17 (6.1)                     | 60 <sup>ab</sup> (11.4) | 46 (2.8)                            |                      |                              |  |

<sup>a</sup>Double PV carrier in *MLH1/BRCA1*. <sup>b</sup>Double PV carrier in *MSH2/ATM*. Frequencies of germline PV found in a subgroup of patients fulfilling criteria for germline genetic testing for LS, HBOC, LS + HBOC, individuals not fulfilling any criteria (non-indicated), an aggregated group of all EC patients, and a group of PMC, respectively. CI, confidence interval; EC, endometrial cancer; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; N, number; N.A., not available; OR, odds ratio; PMC, population-matched controls; PV, pathogenic variant.

EC patients (60/527; 11.4%; Table SIII) than in PMC (46/1662; 2.8%;  $P=9.7 \times 10^{-16}$ ). PV in LS genes were found in 27/527 (5.1%) patients (half of them were *MSH6* PV carriers) and in 4/1662 (0.25%) controls and they represented the strongest genetic risk factor for EC development (OR=22.4,  $P=1.8 \times 10^{-17}$ ). Interestingly, no *PMS2* PV were observed among patients. *BRCA1*, *BRCA2* and *CHEK2* were the most frequently mutated HBOC genes,

their PVs conferred significantly increased EC risk for female carriers. However, this risk was lower in comparison to LS genes (ranging from high EC risk in *BRCA2* to moderate EC risk in *BRCA1* and *CHEK2*, respectively). PV in the remaining 11 HBOC genes were not identified or did not differ significantly from PMC (Table II). Two carriers harbored coincidental mutations in *MLH1/BRCA1* and *MSH2/ATM*, respectively.

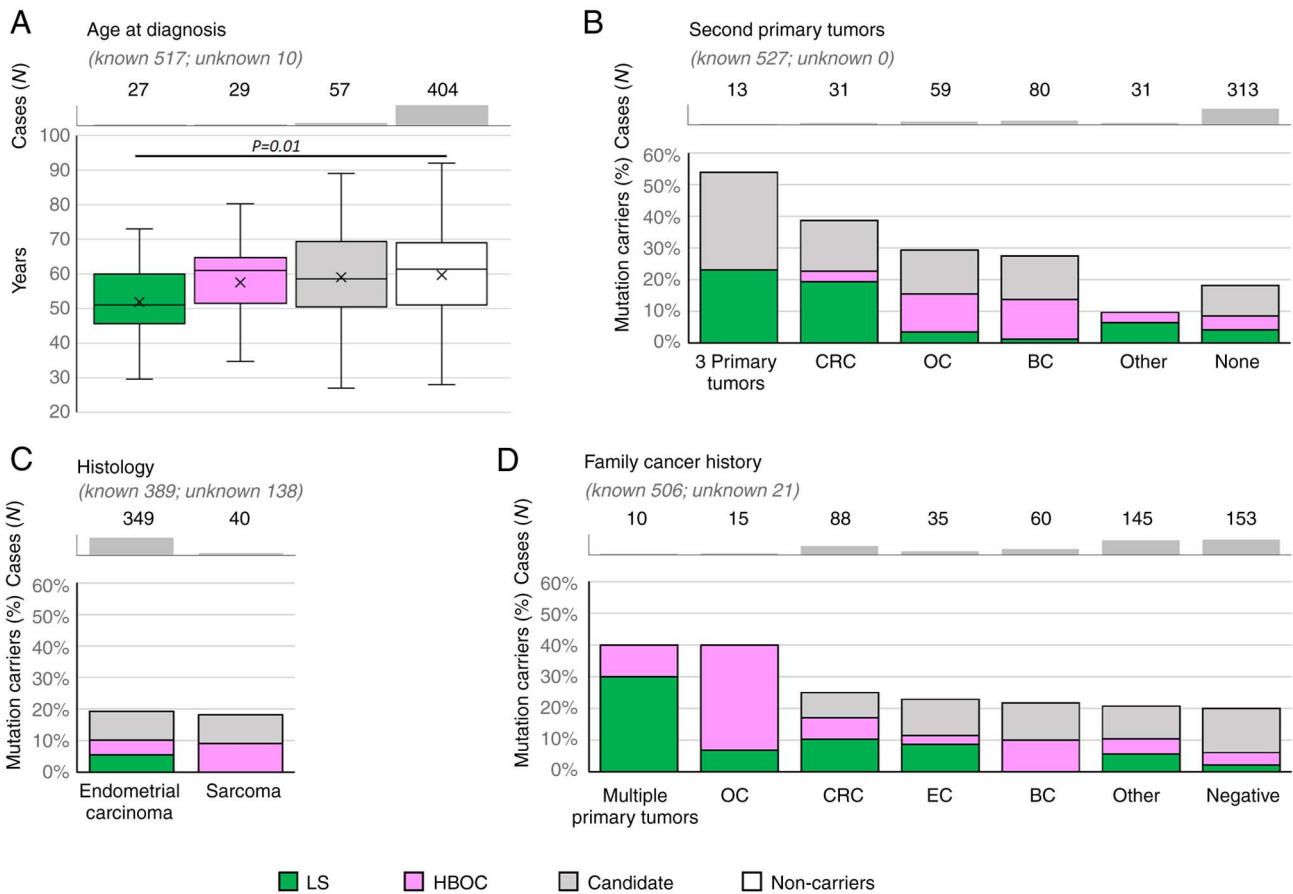


Figure 2. Relative proportion of mutation carriers in clinicopathological subgroups, including (A) age at diagnosis, (B) second primary tumors, (C) histology and (D) family cancer history in 527 patients. Error bars in (A) indicate the first and the fourth quartile. BC, breast cancer; CRC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; OC, ovarian cancer.

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

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

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

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

Regarding subgroups of patients based on indication criteria for genetic testing, the frequency of PV in candidate predisposition genes (after excluding the carriers of

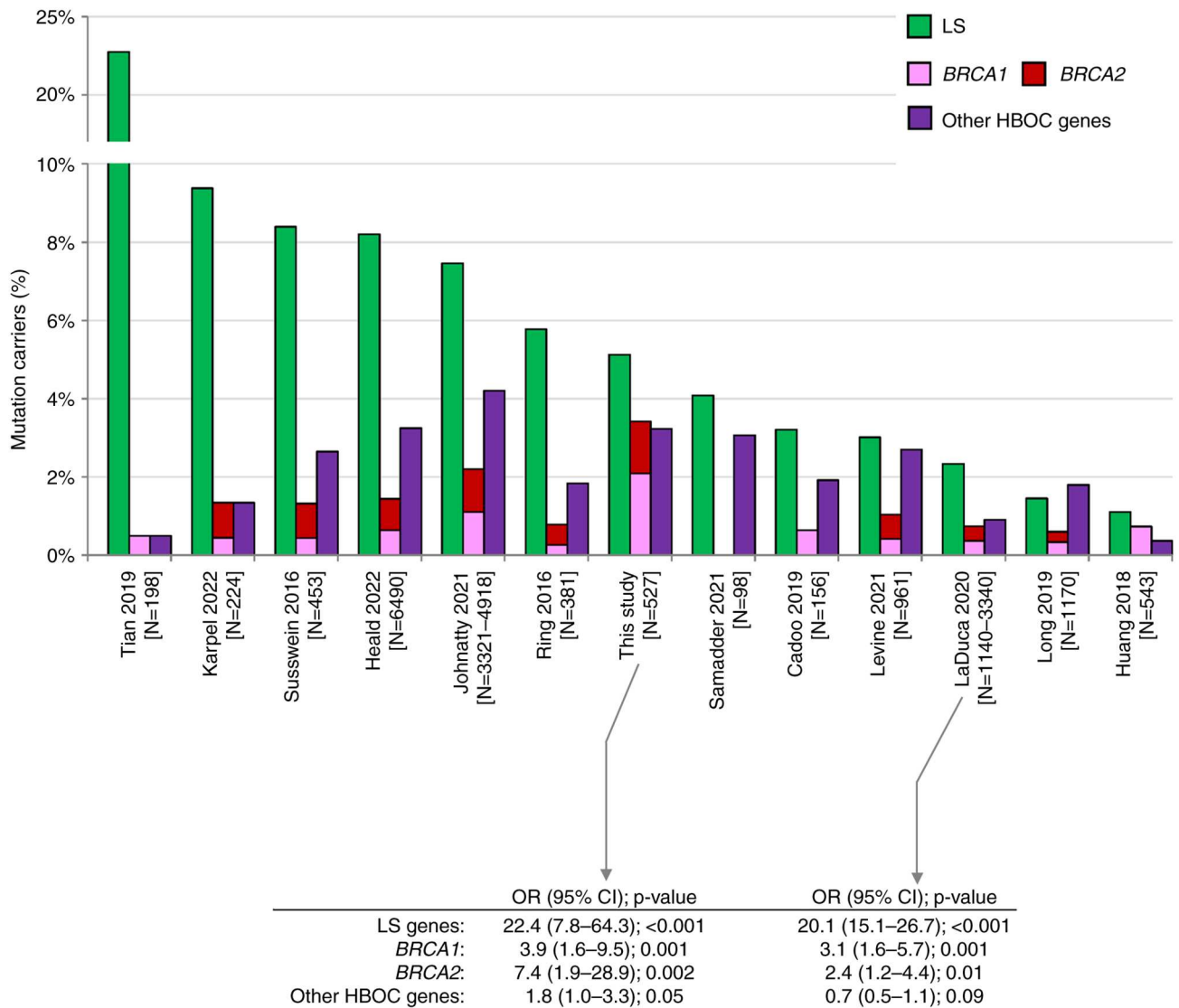


Figure 3. Comparison among previously published studies describing germline PV in patients with endometrial cancer (6–15,28,29). Green, pink, red and purple bars represent the prevalence of PV in LS genes, *BRCA1*, *BRCA2* and other HBOC genes (*ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* and *TP53*), respectively. CI, confidence interval; HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; LS, Lynch syndrome; N, number; OR, odds ratio; PV, pathogenic variant.

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

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

Concerning the histology subtypes (Fig. 2C), the overall frequency of PV in EC-predisposition genes was similar in patients with endometrial carcinoma to those with sarcoma subtypes (39/349, 11.2% and 4/40, 10.0%; respectively); however, no carrier of PV in LS gene was diagnosed with sarcoma. Interestingly, two out of eight patients diagnosed with precancerous EIN (endometrial intraepithelial neoplasia) carried a PV in *BRCA1*. Unfortunately,

the histologic subtypes of endometrial carcinomas other than endometrioid were rarely represented, thus the frequencies of PVs in these subgroups cannot be calculated and compared.

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

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

a family were in concordance with the elevated frequencies of PV in LS or HBOC genes.

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

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

## Discussion

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

Even though only less than 20% of analyzed EC patients (98/527, 18.6%) met the HBOC germline genetic testing criteria, the overall frequencies of PV carriers in *BRCA1/BRCA2* were unusually high in contrast to other studies (Fig. 3). We identified 11 PVs in *BRCA1* (2.1%) and 7 PVs in *BRCA2* (1.3%). Compared to frequencies of PVs in controls we calculated the risks OR=3.9 for *BRCA1* and OR=7.4 for *BRCA2* (Table II). The risk of EC development associated with *BRCA1* and *BRCA2* mutations was substantially lower than in LS carriers, and similar to EC risk reported previously by LaDuca *et al* (29). Our results suggest that PV in *BRCA1/BRCA2* are associated with at least moderate EC risk. Among 16 EC patients meeting only the HBOC criteria, three harbored *BRCA1/BRCA2* mutation. This was also documented by results of a small study by Vietri *et al* (30), who identified PV in *BRCA1/BRCA2* in 9/21 hereditary EC patients fulfilling HBOC testing criteria. In the group of 82 patients meeting both LS and HBOC testing criteria, *BRCA1* PV were more frequent than PV in LS genes. Moreover, up to 5 and 10% of PVs in HBOC genes were identified in non-indicated EC patients with BC in personal or family cancer history, respectively. This further implies that the diagnosis of EC should be considered as a part of indication criteria for HBOC germline genetic testing irrespective to EC histology subtype. Among PV carriers in other HBOC genes, PV in *CHEK2* and *ATM* were the most frequent. Importantly, PV in *CHEK2* were associated with moderately increased risk (OR=3.2, P=0.04). Mutations in *CHEK2* were associated with predisposition to EC in several studies previously (31).

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

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

As expected, other differences in clinicopathological characteristics largely corresponded to subgroups of patients classified according to the germline genetic testing criteria. PV in LS genes were most frequently identified in patients with  $\geq 3$  primary tumors or second primary CRC in personal cancer history, or multiple primary tumors/CRC in family cancer history. Similarly, carriers of PV in HBOC genes recruited in majority from individuals with BC/OC in personal or family cancer history. On the other hand, clinicopathological characteristics did not differ in carriers of candidate EC-predisposition genes and non-carriers.

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

Strengths of our study include homogeneity of studied population consisting of Caucasians, Slavs of the Czech origin and

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

In conclusion, over 11% of EC patients carried a germline PV in genes associated with established germline cancer predisposition. EC patients fulfilling LS criteria had five-times higher chance to carry a LS gene PV than EC patients not fulfilling criteria for germline genetic testing. Presence of PV in LS gene increases the EC risk 20-fold when compared with non-carriers. However, 28.3% of PV carriers in clinically relevant genes would not be indicated for germline genetic testing using current indication criteria. Therefore, we believe that EC as a second primary tumor in proband or occurrence of EC in a family cancer history should be considered within the indication criteria for germline genetic testing. This is of particular importance for countries where reflex testing is not routinely performed in EC patients.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Professor Stanislav Kmoch and Dr Viktor Stranecky (National Center for Medical Genomics, Prague, Czech Republic) (LM2018132) for performing whole-exome sequencing of PMC (project CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_046/0015515).

### Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (grant no. NU20-03-00285), institutional support of the Ministry of Health of the Czech Republic (grant nos. DRO VFN 64165 and DRO MMCI 00209805), the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (grant nos. BBMRI-CZ LM2023033, LM2023067 and LX22NPO5102), the Charles University (grant no. GAUK902120), and the Charles University institutional programs (grant nos. SVV260516 and COOPERATIO, research area DIAG).

### Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed during the current study are not publicly available due to restrictions imposed by national regulatory authorities but are available from the corresponding author on reasonable request.

### Authors' contributions

JK, SJ, MB, LC, MC, PD, KH, MH, SC, MaKo, MoKo, VK, EM, BO, AP and ST performed the experiments. MV, LD, LF, OH, MaKa, JN, MS, JiS, VS, IS and JaS provided additional data, and participated in data analysis and interpretation. PZ,

PN and MZ participated in data analysis and interpretation, as well as revision of the manuscript. PK, ZK, TZ and MJ designed the study and were involved in drafting and editing of the manuscript. JK and MJ confirm the authenticity of all the raw data. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work. All authors have read and approved the final manuscript.

### Ethics approval and consent to participate

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

### Patient consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### References

- Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F and Jemal A: International patterns and trends in endometrial cancer incidence, 1978-2013. *J Natl Cancer Inst* 110: 354-361, 2018.
- Arend RC, Jones BA, Martinez A and Goodfellow P: Endometrial cancer: Molecular markers and management of advanced stage disease. *Gynecol Oncol* 150: 569-580, 2018.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O and Bray F: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 103: 356-387, 2018.
- Raglan O, Kalliala I, Markozannes G, Cividini S, Gunter MJ, Nautiyal J, Gabra H, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Tsilidis KK and Kyrgiou M: Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. *Int J Cancer* 145: 1719-1730, 2019.
- Spurdle AB, Bowman MA, Shamsani J and Kirk J: Endometrial cancer gene panels: Clinical diagnostic vs research germline DNA testing. *Mod Pathol* 30: 1048-1068, 2017.
- Levine MD, Pearlman R, Hampel H, Cosgrove C, Cohn D, Chassen A, Suarez A, Barrington DA, McElroy JP, Waggoner S, *et al*: Up-front multigene panel testing for cancer susceptibility in patients with newly diagnosed endometrial cancer: A multicenter prospective study. *JCO Precis Oncol* 5: 1588-1602, 2021.
- Tian W, Bi R, Ren Y, He H, Shi S, Shan B, Yang W, Wang Q and Wang H: Screening for hereditary cancers in patients with endometrial cancer reveals a high frequency of germline mutations in cancer predisposition genes. *Int J Cancer* 145: 1290-1298, 2019.
- Cadoo KA, Mandelker DL, Mukherjee S, Stewart C, DeLair D, Ravichandran V, Srinivasan P, Hurley D, Kemel Y, Arnold AG, *et al*: Understanding inherited risk in unselected newly diagnosed patients with endometrial cancer. *JCO Precis Oncol* 3: PO.18.00338, 2019.
- Long B, Lilyquist J, Weaver A, Hu C, Gnanaolivu R, Lee KY, Hart SN, Polley EC, Bakkum-Gamez JN, Couch FJ and Dowdy SC: Cancer susceptibility gene mutations in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 152: 20-25, 2019.
- Ring KL, Bruegl AS, Allen BA, Elkin EP, Singh N, Hartman AR, Daniels MS and Broaddus RR: Germline multi-gene hereditary cancer panel testing in an unselected endometrial cancer cohort. *Mod Pathol* 29: 1381-1389, 2016.
- Samadder NJ, Riegert-Johnson D, Boardman L, Rhodes D, Wick M, Okuno S, Kunze KL, Golafshar M, Uson PLS Jr, Mountjoy L, *et al*: Comparison of universal genetic testing vs guideline-directed targeted testing for patients with hereditary cancer syndrome. *JAMA Oncol* 7: 230-237, 2021.

12. Johnatty SE, Pesaran T, Dolinsky J, Yussuf A, LaDuca H, James PA, O'Mara TA and Spurdle AB: Case-case analysis addressing ascertainment bias for multigene panel testing implicates BRCA1 and PALB2 in endometrial cancer. *Hum Mutat* 42: 1265-1278, 2021.
13. Karpel HC, Chern JY, Smith JM, Smith AJ and Pothuri B: Utility of germline multi-gene panel testing in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 165: 546-551, 2022.
14. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, Vogel Postula KJ, Weissman SM, Yackowski L, Vaccari EM, Bissonnette J, Booker JK, Cremona ML, *et al*: Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med* 18: 823-832, 2016.
15. Heald B, Mokhtary S, Nielsen SM, Rojahn S, Yang S, Michalski ST and Esplin ED: Unexpected actionable genetic variants revealed by multigene panel testing of patients with uterine cancer. *Gynecol Oncol* 166: 344-350, 2022.
16. Daniels MS and Lu KH: Genetic predisposition in gynecologic cancers. *Semin Oncol* 43: 543-547, 2016.
17. de Jonge MM, de Kroon CD, Jenner DJ, Oosting J, de Hullu JA, Mourits MJE, Gómez García EB, Ausems MGEM, Margriet Collée J, van Engelen K, *et al*: Endometrial cancer risk in women with germline BRCA1 or BRCA2 mutations: Multicenter cohort study. *J Natl Cancer Inst* 113: 1203-1211, 2021.
18. Mur P, García-Mulero S, Del Valle J, Magraner-Pardo L, Vidal A, Pineda M, Cinnirella G, Martín-Ramos E, Pons T, López-Doriga A, *et al*: Role of POLE and POLD1 in familial cancer. *Genet Med* 22: 2089-2100, 2020.
19. Wieme G, Kral J, Rosseel T, Zemankova P, Parton B, Vocka M, Van Heetvelde M, Kleiblova P, Blaumeiser B, Soukupova J, *et al*: Prevalence of germline pathogenic variants in cancer predisposing genes in Czech and Belgian pancreatic cancer patients. *Cancers (Basel)* 13: 4430, 2021.
20. Lhotova K, Stolarova L, Zemankova P, Vocka M, Janatova M, Borecka M, Cerna M, Jelinkova S, Kral J, Volkova Z, *et al*: Multigene panel germline testing of 1333 Czech patients with ovarian cancer. *Cancers (Basel)* 12: 956, 2020.
21. Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K, Janatova M, Borecka M, Stolarova L, Lhotova F, Foretova L, Machackova E, Stranecky V, *et al*: Validation of CZE CANCA (CZEch Cancer paNel for clinical application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One* 13: e0195761, 2018.
22. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M and DePristo MA: The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20: 1297-1303, 2010.
23. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT and McVean GA: An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491: 56-65, 2012.
24. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, *et al*: The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581: 434-443, 2020.
25. Exome Variant Server NGSPE: Available online: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>. Accessed on 15 March, 2022.
26. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM and Maglott DR: ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 42 (Database Issue): D980-D985, 2014.
27. Miller DT, Lee K, Chung WK, Gordon AS, Herman GE, Klein TE, Stewart DR, Amendola LM, Adelman K, Bale SJ, *et al*: ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American college of medical genetics and genomics (ACMG). *Genet Med* 23: 1381-1390, 2021.
28. Huang KL, Mashl RJ, Wu Y, Ritter DI, Wang J, Oh C, Paczkowska M, Reynolds S, Wyczalkowski MA, Oak N, *et al*: Pathogenic germline variants in 10,389 adult cancers. *Cell* 173: 355-370.e14, 2018.
29. LaDuca H, Polley EC, Yussuf A, Hoang L, Gutierrez S, Hart SN, Yadav S, Hu C, Na J, Goldgar DE, *et al*: A clinical guide to hereditary cancer panel testing: Evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genet Med* 22: 407-415, 2020.
30. Vietri MT, D'Elia G, Caliendo G, Casamassimi A, Federico A, Passariello L, Cioffi M and Molinari AM: Prevalence of mutations in BRCA and MMR genes in patients affected with hereditary endometrial cancer. *Med Oncol* 38: 13, 2021.
31. Stolarova L, Kleiblova P, Janatova M, Soukupova J, Zemankova P, Macurek L and Kleibl Z: CHEK2 germline variants in cancer predisposition: Stalemate rather than checkmate. *Cells* 9: 2675, 2020.
32. Yen TT, Wang TL, Fader AN, Shih IM and Gaillard S: Molecular classification and emerging targeted therapy in endometrial cancer. *Int J Gynecol Pathol* 39: 26-35, 2020.
33. León-Castillo A, Britton H, McConechy MK, McAlpine JN, Nout R, Kommos S, Brucker SY, Carlson JW, Epstein E, Rau TT, *et al*: Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol* 250: 323-335, 2020.
34. Green AK, Feinberg J and Makker V: A review of immune checkpoint blockade therapy in endometrial cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 40: 1-7, 2020.
35. Bychkovskiy BL, Lo MT, Yussuf A, Horton C, Richardson M, LaDuca H, Garber JE and Rana HQ: Prevalence and spectrum of pathogenic variants among patients with multiple primary cancers evaluated by clinical characteristics. *Cancer* 128: 1275-1283, 2022.
36. Stolarova L, Jelinkova S, Storchova R, Machackova E, Zemankova P, Vocka M, Kodet O, Kral J, Cerna M, Volkova Z, *et al*: Identification of germline mutations in melanoma patients with early onset, double primary tumors, or family cancer history by NGS analysis of 217 genes. *Biomedicines* 8: 404, 2020.











This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.



Article

# Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer

Klara Lhotova <sup>1,2</sup>, Lenka Stolarova <sup>1</sup>, Petra Zemankova <sup>1,2</sup>, Michal Vocka <sup>3</sup> , Marketa Janatova <sup>1,2</sup>, Marianna Borecka <sup>1,2</sup> , Marta Cerna <sup>1</sup>, Sandra Jelinkova <sup>1</sup>, Jan Kral <sup>1</sup>, Zuzana Volkova <sup>1</sup>, Marketa Urbanova <sup>2</sup>, Petra Kleiblova <sup>2</sup> , Eva Machackova <sup>4</sup>, Lenka Foretova <sup>4</sup>, Jana Hazova <sup>4</sup>, Petra Vasickova <sup>4</sup>, Filip Lhota <sup>5</sup>, Monika Koudova <sup>5</sup> , Leona Cerna <sup>5</sup>, Spiros Tavandzis <sup>6</sup> , Jana Indrakova <sup>6</sup>, Lucie Hruskova <sup>7</sup>, Marcela Kosarova <sup>8</sup>, Radek Vrtel <sup>9</sup>, Viktor Stranecky <sup>10</sup>, Stanislav Kmoch <sup>10</sup>, Michal Zikan <sup>11</sup>, Libor Macurek <sup>12</sup> , Zdenek Kleibl <sup>1</sup>  and Jana Soukupova <sup>1,2,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University, 128 53 Prague, Czech Republic; Klara.Lhotova@lf1.cuni.cz (K.L.); lenka.stolarova@lf1.cuni.cz (L.S.); petra.boudova@lf1.cuni.cz (P.Z.); mjana@lf1.cuni.cz (M.J.); boreckam@gmail.com (M.B.); marta.cerna@lf1.cuni.cz (M.C.); sandra.jelinkova@lf1.cuni.cz (S.J.); jan.kral@lf1.cuni.cz (J.K.); zuzana.klusonova@lf1.cuni.cz (Z.V.); zdekleje@lf1.cuni.cz (Z.K.)
  - <sup>2</sup> Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic; Marketa.Urbanova@vfn.cz (M.U.); pekleje@lf1.cuni.cz (P.K.)
  - <sup>3</sup> Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; Michal.Vocka@vfn.cz
  - <sup>4</sup> Department of Cancer Epidemiology and Genetics, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic; emachack@mou.cz (E.M.); foretova@mou.cz (L.F.); hazova@mou.cz (J.H.); vasickova@mou.cz (P.V.)
  - <sup>5</sup> Department of Medical Genetics, Centre for Medical Genetics and Reproductive Medicine, Gennet, 170 00 Prague, Czech Republic; Filip.Lhota@gennet.cz (F.L.); Monika.Koudova@gennet.cz (M.K.); Leona.Cerna@gennet.cz (L.C.)
  - <sup>6</sup> Department of Medical Genetics, AGEL Laboratories, AGEL Research and Training Institute, 741 01 Novy Jicin, Czech Republic; spiros.tavandzis@lab.agel.cz (S.T.); jana.indrakova@lab.agel.cz (J.I.)
  - <sup>7</sup> Department of Medical Genetics, GHC Genetics, 110 00 Prague, Czech Republic; hruskova@ghc.cz
  - <sup>8</sup> Department of Medical Genetics, Pronatal, 147 00 Prague, Czech Republic; kosarova@pronatal.cz
  - <sup>9</sup> Department of Medical Genetics, University Hospital Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, 779 00 Olomouc, Czech Republic; radek.vrtel@fnol.cz
  - <sup>10</sup> Research Unit for Rare Diseases, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12808 Prague, Czech Republic; vstra@lf1.cuni.cz (V.S.); skmoch@lf1.cuni.cz (S.K.)
  - <sup>11</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Hospital Na Bulovce and First Faculty of Medicine, Charles University, 180 81 Prague, Czech Republic; michal.zikan@lf1.cuni.cz
  - <sup>12</sup> Laboratory of Cancer Cell Biology, Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague, Czech Republic; libor.macurek@img.cas.cz
- \* Correspondence: jana.soukupova@lf1.cuni.cz; Tel.: +420-224965739

Received: 15 March 2020; Accepted: 10 April 2020; Published: 13 April 2020



**Abstract:** Ovarian cancer (OC) is the deadliest gynecologic malignancy with a substantial proportion of hereditary cases and a frequent association with breast cancer (BC). Genetic testing facilitates treatment and preventive strategies reducing OC mortality in mutation carriers. However, the prevalence of germline mutations varies among populations and many rarely mutated OC predisposition genes remain to be identified. We aimed to analyze 219 genes in 1333 Czech OC patients and 2278 population-matched controls using next-generation sequencing. We revealed germline mutations in 18 OC/BC predisposition genes in 32.0% of patients and in 2.5% of controls. Mutations in *BRCA1/BRCA2*, *RAD51C/RAD51D*, *BARD1*, and mismatch repair genes conferred high OC risk (OR > 5). Mutations in

*BRIP1* and *NBN* were associated with moderate risk (both OR = 3.5). *BRCA1/2* mutations dominated in almost all clinicopathological subgroups including sporadic borderline tumors of ovary (BTO). Analysis of remaining 201 genes revealed somatic mosaics in *PPM1D* and germline mutations in *SHPRH* and *NAT1* associating with a high/moderate OC risk significantly; however, further studies are warranted to delineate their contribution to OC development in other populations. Our findings demonstrate the high proportion of patients with hereditary OC in Slavic population justifying genetic testing in all patients with OC, including BTO.

**Keywords:** ovarian cancer; next-generation sequencing; predisposition genes; cancer risk; mutation

---

## 1. Introduction

Ovarian cancer (OC) is the most severe gynecologic malignancy with stable incidence and mortality. The most frequent OC types (85–95%) are epithelial tumors, which are high-grade (HG) serous in 70% of cases [1,2]. Because of the nonspecific symptoms and a lack of presymptomatic screening modalities, most women are diagnosed with an advanced disease, having a dismal 25% 5-year survival rate [3].

The overall OC lifetime risk oscillates around 2% in the general female population in developed countries. Central and Eastern Europe, including the Czech Republic, represented a region with the highest OC incidence (11.9 ASRW per 100,000 females) and mortality (6.0 ASRW per 100,000 females) worldwide in 2018 (<http://gco.iarc.fr>). In the Czech Republic alone, annual OC incidence and mortality in 2018 reached 9.5 and 6.7 ASRW per 100,000 females, respectively.

Genetic predisposition for OC is unusually high and is reported in up to 25% of cases [4–6]. The most frequent germline mutations affect the *BRCA1* and *BRCA2* genes, conferring 24% and 8.4% OC lifetime risks, respectively [7]. The *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers frequently but not exclusively develop HG serous OC [8]. Carriers of mutations in these major OC predisposition genes have also very high risk of breast cancer (BC) development. A high OC risk has also been associated with germline mutations in *RAD51C*, *RAD51D*, Lynch syndrome genes, and *STK11*; a moderate OC risk with *BRIP1* [9–13]. Risks associated with germline mutations in genes with anticipated BC and/or OC predisposition (incl. *ATM*, *BARD1*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN*, and *TP53*) and in other candidate genes remain to be determined [14–17]. The identification of presymptomatic women at high risk who can benefit from risk-reducing salpingo-oophorectomy (RRSO) is of critical importance, as demonstrated by the reduced OC mortality in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers undergoing preventive surgery [18].

In this report, we aim to establish an association of germline mutations with OC in the Czech patients belonging to the Slavic population that has not been systematically analyzed for OC predisposition. Seven Czech genetic laboratories participated in the analysis of 1333 Czech OC patients by the identical procedure using CZE CANCA panel (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) targeting 219 genes [19]. Prevalence of variants in genes affected in OC patients was assessed in 2278 population-matched controls. This analysis enabled us to comprehensively determine mutations frequency and clinicopathological characteristics of OC in carriers of mutations in genes with known OC predisposition but also to analyze contribution of population-specific variants in other candidate genes to OC predisposition.

## 2. Results

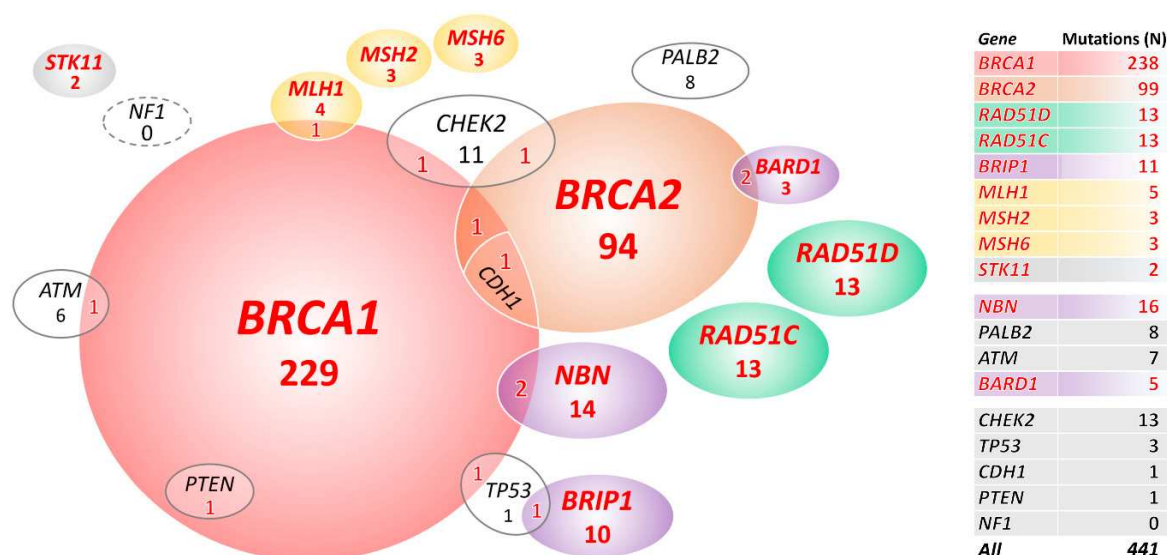
### 2.1. Description of Study Population

Altogether, samples obtained from 1333 OC patients diagnosed at seven centers were analyzed by the identical panel NGS using the CZE CANCA panel targeting 219 cancer-predisposition and candidate genes and were evaluated centrally by the identical bioinformatics pipeline. From 1333

analyzed OC patients, 1045 (78.4%) women were diagnosed with OC only and 288 (21.6%) women with double primary tumors, including BC (210 patients; 15.8%) or other tumors (78 patients; 5.9%). The median age at OC diagnosis was 53.7 years (range 15–86 years). Almost half (47.6%) of the patients had a negative family cancer history. From 1120 OC patients with known histology, 728 (65.0%) women developed serous adenocarcinoma with prevailing HG tumors. Sixty percent of cases represented patients with advanced disease (stages III–IV). The clinicopathological characteristics are provided in Table S1.

## 2.2. Mutations in 18 Known/Anticipated Hereditary BC/OC Genes

We primarily focused on mutations in 18 BC/OC genes listed in the NCCN Guidelines for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic (Version 1.2020; 4 December 2019). We identified 441 mutations in 427/1333 (32.0%) OC patients and 58/2278 (2.5%) mutation carriers among population-matched controls (PMC) in 18 known/anticipated BC/OC genes (Figure 1, Table 1, and Table S2). Thirteen multiple mutation carriers (Figure 1) identified among patients only (characterized in Table S3) were excluded from the subsequent analyses.



**Figure 1.** Overall, 427 mutation carriers of 441 mutations in 18 known/anticipated breast cancer (BC)/ovarian cancer (OC) predisposition genes. In total, 399 carriers in genes significantly associated with OC in our study are highlighted in bold letters. *STK11* is highlighted as rarely mutated but established OC predisposition gene.

Carriers of germline mutations in 10 genes (including Lynch syndrome genes analyzed as a group together) had significantly increased OC risk (Table 1 in bold). We found the prevailing *BRCA1* or *BRCA2* germline alterations in 323/1320 (24.5%) patients and in 12/2278 (0.5%) PMC. Further, 65/1320 (4.9%) OC patients carried a mutation in 8 other genes significantly associated with OC risk in our study (including 2 carriers of mutations in *STK11*, an established high-risk OC gene that did not reach significant association in our study due to low frequency of mutation carriers in patients; Figure 1). We found only 19/2278 (0.8%) carriers of mutations in these 8 genes in PMC.

**Table 1.** Mutation frequencies in 1320 ovarian cancer cases and in 2278 population-matched controls (PMC).

| Gene   | 1320 OC Patients <sup>(a)</sup><br>N Mutations (%) | 2278 PMC<br>N mutations (%) | OR (95% CI); p <sup>(a)</sup>             |
|--|--|-----------------------------|---|
| Increased OC risk <sup>(b)</sup>                                     |  |                             |   |
| <i>BRCA1</i> <sup>(c)</sup>  | 229 (17.35)  | 5 (0.22)                    | 95.2 (40.1–295.2); $1.83 \times 10^{-97}$ |
| <i>BRCA2</i> <sup>(c)</sup>  | 94 (7.12)  | 7 (0.31)                    | 24.9 (11.6–63.6); $1.16 \times 10^{-33}$  |
| <i>RAD51D</i>  | 13 (0.98)  | 2 (0.09)                    | 11.3 (2.6–103.4); $9.66 \times 10^{-5}$   |
| <i>RAD51C</i>  | 13 (0.98)  | 4 (0.18)                    | 5.7 (1.7–23.8); 0.001                     |
| <i>BRIP1</i> <sup>(c)</sup>  | 10 (0.76)  | 5 (0.22)                    | 3.5 (1.1–13); 0.03                        |
| <i>MLH1</i> <sup>(c)</sup>   | 4 (0.3)  | 1 (0.04)                    | 6.9 (0.7–340.4); 0.06 <sup>(d)</sup>      |
| <i>MSH2</i>  | 3 (0.23)   | 0                           | 0.049 <sup>(d)</sup>                      |
| <i>MSH6</i>  | 3 (0.23)   | 0                           | 0.049 <sup>(d)</sup>                      |
| <i>STK11</i>   | 2 (0.15)   | 0                           | 0.13                                      |
| Potentially increase or insufficient evidence OC risk <sup>(b)</sup> |  |                             |   |
| <i>NBN</i> <sup>(c)</sup>  | 14 (1.06)  | 7 (0.31)                    | 3.5 (1.3–10.2); 0.006                     |
| <i>PALB2</i>   | 8 (0.61)   | 9 (0.40)                    | 1.5 (0.5–4.5); 0.45                       |
| <i>ATM</i> <sup>(c)</sup>  | 6 (0.45)   | 8 (0.35)                    | 1.3 (0.4–4.3); 0.78                       |
| <i>BARD1</i> <sup>(c)</sup>  | 3 (0.23)   | 0                           | 0.049                                     |
| No increased risk of OC <sup>(b)</sup>                               |  |                             |   |
| <i>CHEK2</i> <sup>(c)</sup>  | 11 (0.83)  | 8 (0.35)                    | 2.4 (0.9–6.8); 0.06                       |
| <i>TP53</i> <sup>(c)</sup>   | 1 (0.08)   | 2 (0.09)                    | 0.9 (0–16.6); 1                           |
| <i>CDH1</i> <sup>(c)</sup>   | 0  | 0                           | -   |
| <i>PTEN</i> <sup>(c)</sup>   | 0  | 0                           | -   |
| <i>NF1</i>   | 0  | 0                           | -   |

<sup>(a)</sup> Prevalence of mutations in all 1333 patients (including 13 multiple mutation carriers) is provided in Table S2.

<sup>(b)</sup> Gene classification according to the NCCN guidelines version 2020.1. <sup>(c)</sup> Excluding 13 multiple mutation carriers described in Figure 1 and Table S3. <sup>(d)</sup> When analyzed Lynch syndrome genes collectively: OR = 22.63 (95% CI 3.4–958.5);  $p = 1.95 \times 10^{-05}$ .

The copy number variation (CNV) analysis in 18 OC/BC genes revealed 37 large genomic rearrangements in 37/1333 (2.8%) patients. They affected seven genes (23×*BRCA1*, 4×*BRIP1*, 4×*CHEK2*, 2×*MLH1*, 2×*STK11*, 1×*PALB2*, and 1×*CDH1*) and accounted for 8.4% (37/441) of all pathogenic mutations in these genes. Except 1 whole gene duplication of *MSH6* (classified as VUS), we found no CNV in analyzed controls in these 18 genes.

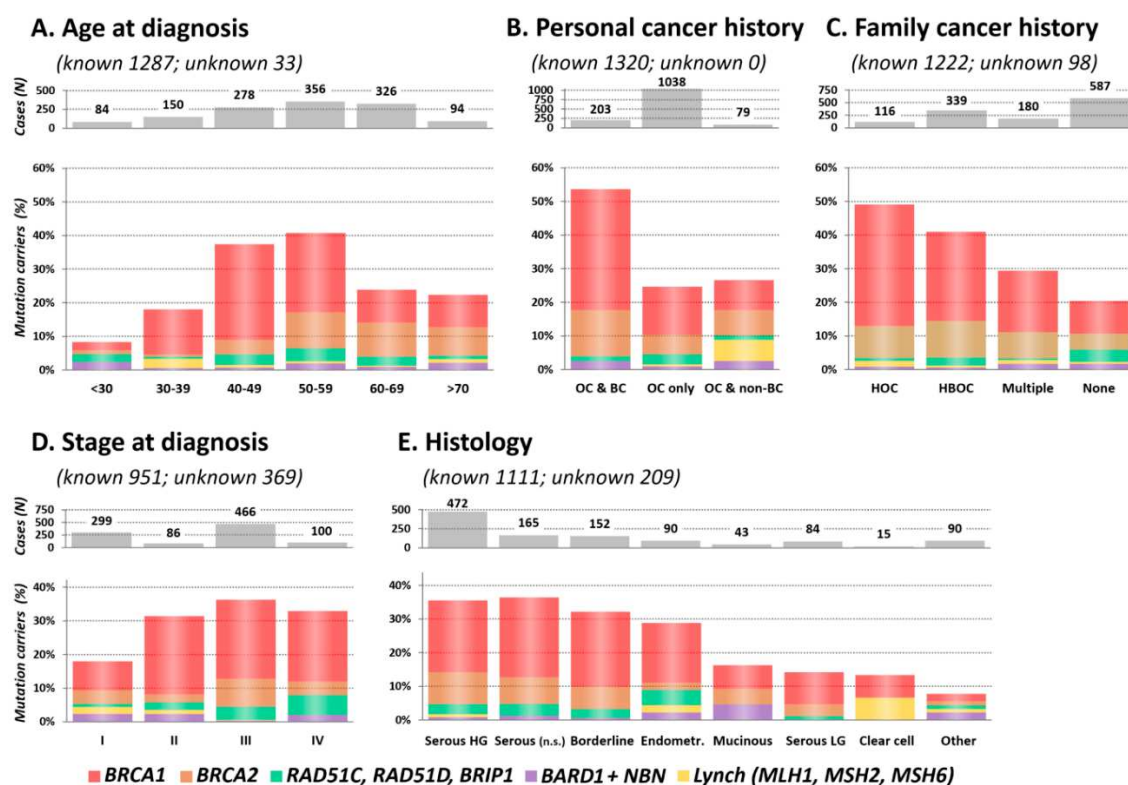
### 2.3. Clinical and Histopathological Characteristics of Mutation Carriers

Subsequently, we described the clinicopathological characteristics of the mutation carriers in 10 genes associated with OC risk (Figure 2 and Table S4). Multiple mutation carriers (Table S3) were excluded from this analysis.

#### 2.3.1. Age at OC Diagnosis

The highest mutation frequency was found in patients diagnosed with OC at 40–49 and 50–59 years (37.4% and 40.7%, respectively) and the lowest in patients diagnosed before the age of 30 (8.3%; Figure 2A). Interestingly, the mutation frequency in the group of the oldest patients ( $\geq 70$  years) was twice higher than in the youngest (<30 years) patients' subgroup ( $p = 0.013$  for difference).

This difference was primarily caused by *BRCA1/BRCA2* mutations (3.6% vs. 18.1% in patients <30 vs. ≥70 years), as the frequency of *non-BRCA* genes mutations was similar (4.8% vs. 4.3%). The median age at diagnosis was significantly different in *BRCA1* (51.0 years; range 23–78) and *BRCA2* (58.4 years; range 27–78) mutation carriers ( $p = 8.5 \times 10^{-10}$ ), respectively. The median age at diagnosis in other genes with at least 10 identified mutation carriers increased gradually from *RAD51C* (52.2 years; range 25–69) to *NBN* (54.5 years; range 18–76), *RAD51D* (56.0 years; range 36–69), and *BRIP1* (58.0 years; range 30–71). We observed a younger median age at diagnosis in carriers of mutations in Lynch syndrome genes 46.0 years (range 35–73).



**Figure 2.** Proportion of mutation carriers in clinicopathological subgroups, including (A) Age at OC diagnosis; (B) Personal cancer history; (C) Family cancer history; (D) Stage at diagnosis; (E) Histology in 1320 OC patients.

### 2.3.2. Personal and Family Cancer History

The highest proportion of mutations (109/203; 53.7%) was detected in double primary OC and BC patients, while in patients diagnosed with OC only and double primary OC and non-BC cancer, it reached 256/1038 (24.7%) and 21/79 (26.6%), respectively (Figure 2B). The frequency of mutations in patients from hereditary OC families (HOC) was 49.1% (57/116; Figure 2C). Decreasing proportion of mutation carriers in other family cancer history categories (41.0% in HBOC and 29.4% in multiple cancer) was dominantly caused by decreasing *BRCA1* mutation prevalence. Nevertheless, in 587 OC patients without a positive family cancer history, we still identified 120 (20.4%) carriers of pathogenic mutations.

### 2.3.3. Stage and Histology

Almost 60% of patients were diagnosed at FIGO stage III or IV (Figure 2D). In contrast, 6/8 informative Lynch syndrome gene mutation carriers were diagnosed with stage I tumors.

The mutation rate stratified OC into two histological clusters. The high mutation rate subgroup included 879 patients with HG/unspecified serous, borderline, and endometrioid tumors with 303 (34.5%) carriers, while the low mutation rate subgroup included 232 patients with low-grade (LG)

serous, mucinous, clear cell, and other tumors with 28 (12.1%) carriers. *BRCA1/2* mutations in HG serous carcinomas were more than twice as frequent (146/472; 30.9%) as in LG serous ones (11/84; 13.1%). Interestingly, the distribution of *BRIP1/RAD51C/RAD51D* mutations among histological types was similar to that of *BRCA1/2*. The lowest proportion of mutations (7/90; 7.8%) was found in rare histological cancer types (herein denominated as “Other”).

#### 2.4. Mutations in Additional 201 Analyzed Genes

Finally, we reviewed the presence of germline variants in additional 201 genes targeted by the CZECANCA panel [19]. This analysis revealed 230 mutations in 89 genes in 208 (15.6%) patients (Table S5). Of these, 149 (11.2%) patients carried mutations in “additional” genes exclusively while 59 (4.4%) patients carried a mutation in “additional” genes alongside a mutation in one of the 10 OC risk genes. Mutations in these “additional” genes were rare and their prevalence was significantly higher in patients over controls in only four genes (Table 2). However, only mutations in *PPM1D* were significantly associated with OC risk ( $p = 0.003$ ) following Bonferroni correction and exclusion of carriers of mutations in OC predisposition genes. All *PPM1D* mutations were mosaic with MAF = 14%–60% and MAF = 17%–19% in patients and controls, respectively. It should be noted that blood for genetic testing was sampled after the application of chemotherapy in all *PPM1D* positive patients (in average at 38 months after treatment; ranged 4 months–7.1 years). Seven out of 15 *PPM1D* mutation carriers harbored an additional mutation in another DNA repair gene (3×*BRCA2*, 1×*PALB2*, 1×*EXO1*, and 1×*PMS1*). MAF of *PPM1D* mutations correlated neither with age at OC diagnosis nor with the time from the last chemotherapy (Table S6). Mutations in *PPM1D* and *SHPRH* were significantly associated only with age > 60 years ( $p = 0.001$ ), whereas frequency of *NAT1* mutations in particular categories was similar (Table S7). Uncorrected p values were marginally significant also for germline variants in *MMP8* and *FANCG* in OC patients when carriers of mutations in 10 BC/OC predisposition genes significantly associating with OC risk in our study were excluded (Table 2).

**Table 2.** Additional 201 analyzed genes significantly associated with OC risk in the group of all OC patients and in a subgroup of 934 patients without mutations in 10 established OC predisposition genes.

| Gene  | Patients N<br>Mutations (%) | 2278 PMC N<br>Mutations (%) | OR (95% CI); p (Bonferroni Corrected p)           |
|---|-----------------------------|-----------------------------|---|
| All 1333 OC patients  |                             |                             |   |
| <i>PPM1D</i>  | 16 (1.20)                   | 2 (0.09)                    | 13.82 (3.24–124.22); $7.4 \times 10^{-6}$ (0.001) |
| <i>NAT1</i>   | 13 (0.98)                   | 5 (0.22)                    | 4.48 (1.49–16.07); 0.003 (n.s.)                   |
| <i>SHPRH</i>  | 5 (0.38)                    | 1 (0.04)                    | 8.57 (0.96–404.83); 0.028 (n.s.)                  |
| 934 OC patients without mutations in 10 genes significantly associated with OC in our study |                             |                             |   |
| <i>PPM1D</i>  | 12 (1.28)                   | 2 (0.09)                    | 14.80 (3.28–136.67); $1.7 \times 10^{-5}$ (0.003) |
| <i>NAT1</i>   | 8 (0.86)                    | 5 (0.22)                    | 3.96 (1.13–15.30); 0.026 (n.s.)                   |
| <i>MMP8</i>   | 6 (0.64)                    | 4 (0.18)                    | 3.67 (0.87–17.74); 0.041 (n.s.)                   |
| <i>FANCG</i>  | 5 (0.53)                    | 2 (0.09)                    | 6.12 (1.00–64.45); 0.025 (n.s.)                   |

n.s., nonsignificant.

### 3. Discussion

The analysis of 1333 Czech OC patients and 2278 population-matched controls provides the most comprehensive view of the genetic architecture of OC predisposition in the Slavic population. From 18 OC/BC predisposition genes listed in current NCCN breast/ovarian familial cancer guidelines, mutations in 10 genes were significantly associated with OC risk in our population being present in 399/1333 (29.9%) OC patients and 31/2278 (1.4%) PMC (Figure 1). Mutations in eight remaining genes were extremely rare (*CDH1*, *PTEN*, *STK11*, and *TP53*) or absent (*CDKN2A* and *NF1*) or did not significantly differ in frequency among cases and controls (*ATM*, *PALB2*, and *CHEK2*). Mutations in *BRCA1/2*, *RAD51C/D*, and Lynch syndrome genes were associated with a high OC risk, while mutations in *BRIP1* were associated with a moderate OC risk in our study (Table 1), in concordance with previous

reports [9,10,20,21]. The *BRCA1* and *BRCA2* mutations, present in 84.0% of all mutation carriers, were by far the most frequent alterations found in 17.9% and 7.4% of our patients, respectively. Mutations in other eight genes led by *RAD51C/RAD51D/BRIP1* affected additional 5.0% of patients, as shown also by others recently [5,6,22]. Germline mutations in Lynch syndrome genes together associated with high OC risk. Mutations in *MLH1* prevailed similarly as in Lynch syndrome patients diagnosed with colorectal cancer [23].

In contrast to previous studies, our results suggest increased OC risk in carriers of *NBN* and *BARD1* mutations [12,24]. We did not find significant increase of OC risk for carriers of mutations in *ATM* and *PALB2*, as noticed previously [12,24,25]. However, further analyses considering very large population-matched studies or studies considering families of mutation carriers can better disclose moderate risk associations, as shown for *PALB2* mutations recently [26].

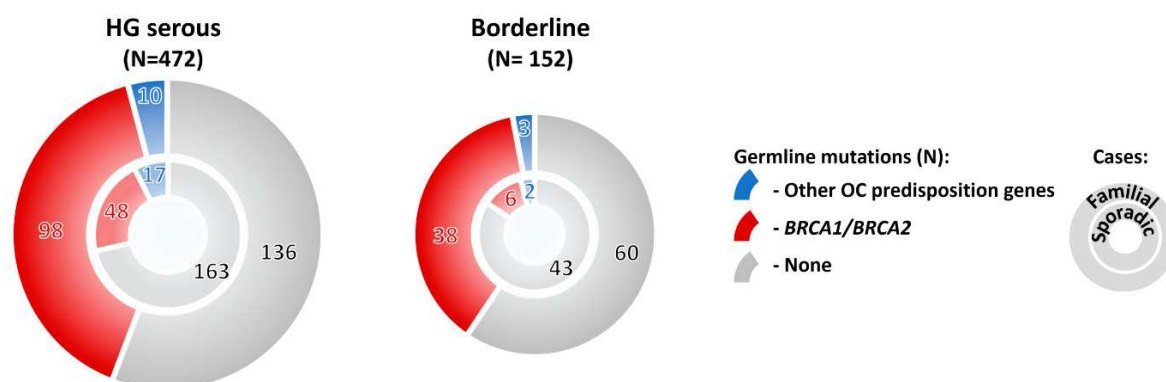
Overrepresentation of mutations in the *CHEK2* gene in OC patients in this study was marginally nonsignificant in contrast to our previous report where we identified moderately increased OC risk for *CHEK2* mutation carriers [27]. However, last four *CHEK2* coding exons were not targeted in our gene panel omitting possible deleterious *CHEK2* alterations identified in our previous study in which last four coding exons were analyzed separately in both cases and controls. Mutations in *NF1* were absent and were extremely rare in *CDH1* and *PTEN*, just like *STK11* mutations found in a patient with nonepithelial OC, a characteristic Peutz–Jeghers syndrome manifestation [9]. Altogether, the high overall frequency of mutations in OC predisposition genes in our study is in agreement with some previous studies [4–6,28] and may contribute to a high OC incidence in our population.

Multigene testing revealed 13 carriers of multiple pathogenic mutations (1.0% of patients). Similar frequency of individuals with this multilocus inherited neoplasia alleles syndrome (MINAS) [29] was shown also in previous analyses of OC patients [30,31].

We analyzed available phenotype characteristics in 1320 OC patients with one pathogenic mutation at the most in 10 genes associated with OC risk in our study (Figure 2). While the highest prevalence of *BRCA1/2* mutation carriers was in patients diagnosed with double primary OC and BC, mutations in *RAD51C/RAD51D/BRIP1* prevailed in patients diagnosed with OC only (Figure 2B); nevertheless, their distribution among histological subtypes was similar to that in *BRCA1/2* mutation carriers (Figure 2E). In contrast to Castera et al. who found mutations in *RAD51C/RAD51D/BRIP1* dominantly in French OC patients with a positive family OC history [32], we identified mutations in these genes in 1/116 (0.9%) and 22/587 (3.7%) carriers in HOC patients and in patients with a negative family cancer history, respectively. Further, we have noticed a surprisingly high frequency of OC-predisposing mutations in older patients. Their prevalence in patients  $\geq 60$  years was 23.6%, whereas Harter et al. found in this age group 18.9% mutation carriers even though frequency of mutation carriers in patients  $<60$  years in both studies was comparable (32.6% and 33.2%, respectively) [28]. *BRCA1* mutations dominated in patients  $<60$  years over *BRCA2* mutations, while in patients  $\geq 60$  years, their frequencies were comparable. Moreover, we revealed 29 *BRCA1/2* mutation carriers (13.9% of patients) in 208 OC patients diagnosed at  $\geq 60$  years with no family cancer history, while Morgan and colleagues detected only two (4.3%) *BRCA1/2* mutations in 46 sporadic OC patients  $\geq 60$  years [33]. Even in the oldest subgroup of our OC patients diagnosed at  $\geq 70$  years, the frequency of *BRCA1/2* mutation carriers exceeded 18%, while in other studies, *BRCA1/2* mutations' frequency in this age category was below 10% [34,35]. This high frequency of *BRCA1/2* mutations in our patients  $\geq 70$  years contrasted with a low frequency in women diagnosed at  $<30$  years (18.1% vs. 3.6%;  $p = 0.003$ ; Figure 2A). The difference was even more apparent in "sporadic" OC cases (with no family cancer history), where *BRCA1/2* mutations were found in 6 out of 45 (13.3%) women  $\geq 70$  years but in none of 52 cases diagnosed at  $<30$  years. It should be emphasized that although rare histological OC types were more frequent in the subgroup of 52 patients diagnosed with sporadic OC at  $<30$  years, 32 (65.3%) of 49 informative cases developed invasive epithelial OC.

Mutations in OC predisposition genes significantly prevailed in subgroups with high-grade/nonspecified serous, borderline, and endometrioid tumors over subgroup with low-grade serous,

mucinous, clear cell, or other rare histologic types (Figure 2E). Surprisingly, the overall mutation frequency in patients with borderline tumors was comparable with that of in HG serous OC (32.2% and 36.7%, respectively; Figure 2E). Thus, we compared mutation frequency in patients with no family cancer history diagnosed with these histological tumor types, and we found that although the mutation frequency in sporadic borderline tumors was half in comparison to sporadic HG serous (Figure 3), it still largely exceeded 10% in both hereditary and sporadic cases, justifying the genetic testing of borderline tumors. The large proportion of borderline tumors with positive family cancer history in our study suggested that this OC subtypes belong to a possible manifestation of a cancer predisposition. However, our observation needs to be confirmed in other populations as current reports about borderline tumors in *BRCA1/2* mutation carriers are limited.



**Figure 3.** Frequency of mutations in 10 BC/OC predisposition genes significantly associated with OC in our study in OC patients with high-grade (HG) serous and borderline tumors, respectively. The patients were subdivided into subgroups with positive (familial cases) and negative (sporadic cases) family cancer history, respectively.

The multigene panel enabled us to identify other candidate genes associating with increased OC risk. We noticed many rare truncating variants episodically affecting various genes and clustering into *PPM1D*, *NAT1*, and *SHPRH* in OC patients. The *PPM1D* gene, coding for WIP1 phosphatase, was the only candidate associated with OC risk following multiple testing correction. Similarly to the previous studies describing its mosaic variants in OC patients [36–38], we also found mosaic gain-of-function mutations resulting in increased WIP1 phosphatase activity [38]. All *PPM1D* mutations in our patients were identified in postchemotherapy treatment blood samples suggesting their somatic origin [39]. Germline mutations in *NAT1* have not been analyzed for OC predisposition so far. However, several polymorphisms in *NAT1* (coding for arylamine N-acetyltransferase 1 engaged in carcinogen metabolism and detoxification) were shown to modify the risk of various cancers [40,41]. The *SHPRH* gene codes for E3 ubiquitin-protein ligase targeting PCNA upon DNA damage [42]. Contribution of *SHPRH* germline variants to OC risk remains elusive. Overall, low mutation frequencies found in gene candidates in our study precluded its precise OC risk estimations and will require large, multiethnic, case-control studies, segregation analyses in affected families, and functional analyses. Alongside variants clustering to a few candidate genes, we identified rare mutations in a gene family coding for Fanconi anemia (FA) proteins involved in the repair of DNA interstrand crosslinks [43]. Several FA genes belong to established OC predisposition genes, including *BRCA1* (*FANCS*), *BRCA2* (*FANCD1*), *RAD51C* (*FANCO*), *PALB2* (*FANCN*), and *BRIPI1* (*FANCF*). Except these, we found rare mutations in other FA genes (*FANCG*, *FANCD2*, and *FANCA*) in 11 (0.83%) of 1333 OC patients compared to 5 in 2278 PMC (0.2%), with cumulative OR = 3.78 (95% CI 1.21–13.91;  $p = 0.02$ ). Interestingly, these rare mutations were detected almost exclusively in patients without mutations in other OC predisposition genes.

The strengths of this study include an identical NGS analysis and bioinformatics pipeline in all patients, a careful curation of clinical data, and an ethnically homogeneous set of patients and controls representing the largest sample set from the region of Central and Eastern Europe. Despite



that, the number of individuals still did not allow the precise OC risk calculations in rarely mutated genes. Although all OC cases in the Czech Republic are eligible for genetic testing, OC patients with positive family cancer history and earlier-onset individuals were enriched in our study, especially in a small subgroup enrolled before 2015 (in the Center A only).

Whether the high prevalence of clinically important germline mutations in OC patients justifies population-wide screening is a vivid matter of debate [44–48]. We emphasize that we found *BRCA1/2* mutations in 14.5% of OC patients with no family cancer history who would currently not be revealed presymptomatically without population screening. We assume that careful application of germline testing in all OC patients and their relatives would reduce OC burden in our population. Moreover, the mutations in *BRCA1/2* [49,50] and other OC predisposition genes [51,52] represent valuable predictive biomarkers improving OC chemotherapy.

#### 4. Materials and Methods

Analyzed patients ( $N = 1333$ ) were enrolled in 2010–2018 and included all OC cases regardless of familial cancer history or OC histology subtypes. As knowledge about germline mutations' frequency in women diagnosed with BTO is limited, we included these histological subtypes to our study. Clinicopathological data were obtained during genetic counselling or retrieved from the patients' records. OC patients with a positive cancer family history were stratified into (i) hereditary ovarian cancer (HOC) families with OC and other nonbreast cancer (BC) in the family history; (ii) hereditary breast and/or ovarian cancer (HBOC) families with BC and OC or other cancer in the family history, and (iii) multiple cancer families with non-OC and non-BC in the family history. Index patients were tested in seven centers: (A) First Faculty of Medicine, Charles University, Prague ( $N = 637$ ); (B) Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno ( $N = 357$ ); (C) Gennet, Prague ( $N = 273$ ); (D) AGEL Laboratories, Novy Jicin ( $N = 34$ ); (E) GHC Genetics ( $N = 12$ ); (F) Pronatal ( $N = 11$ ), and (G) University Hospital Olomouc ( $N = 9$ ).

Population-matched controls (PMC;  $N = 2278$ ) included 616 noncancer controls collected in centers A ( $N = 344$ ), B ( $N = 150$ ), and D ( $N = 122$ ), and 1662 unselected controls provided by the National Center for Medical Genomics (<http://ncmg.cz>). The noncancer controls were volunteers (78 males and 538 females) aged  $\geq 60$  years without a personal or family cancer history (in first-degree relatives). The unselected controls (1170 males and 492 females; median age 57 years, range 18–88 years) were unrelated individuals analyzed by whole-exome sequencing (WES) for various noncancer conditions.

All patients and controls were Caucasians of a Czech origin. Written informed consent was obtained from all patients and controls. The study was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague; ethics approval number was 92/14. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

##### 4.1. Next-Generation Sequencing

Germline blood-derived DNA was analyzed by the CZECA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application; custom-made SeqCap EZ choice panel; Roche) panel NGS targeting 219 genes on MiSeq (Illumina), as described in details previously [19]. Sequencing reads were aligned by Novoalign v2.08.03 to the human reference genome (hg19). Variants were identified using GATK and Pindel, CNVs using CNV score [19]. The entire diagnostic pipeline was successfully tested using European Molecular Genetics Quality Network schemes (EMQN) and validated as we have described recently [19].

##### 4.2. Variant Classification

We first analyzed 18 genes considered clinically relevant to the HBOC syndrome (MIM #604370) by NCCN, namely, *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, and *TP53*. Germline variants (with frequency  $\leq 0.01$  and  $\leq 0.05$  in 1000 Genomes project and noncancer PMC, respectively) were classified into three

groups: i) pathogenic/likely pathogenic, ii) variants of unknown significance (VUS), and iii) likely benign/benign, based on recommendations from the ENIGMA consortium (<https://enigmaconsortium.org>). All nonsense/frameshift/splicing ( $\pm 1$ –2 bp) mutations/CNVs were considered pathogenic/likely pathogenic unless classified as other in the ClinVar database; whole gene duplications were considered VUS. The other types of mutations were considered pathogenic/likely pathogenic only if classified as such in ClinVar by at least two submitters. TP53 variants were classified using the IARC TP53 database (<http://p53.iarc.fr/>), CHEK2 VUS using a recently published functional assay [27].

Subsequently, we analyzed variants in another 201 genes targeted by the CZEKANCA panel. Nonsense/frameshift/splicing ( $\pm 1$ –2 bp) mutations/CNVs (except whole gene duplications) with frequency  $\leq 0.01$  and  $\leq 0.05$  in 1000 Genomes project and in noncancer PMC, respectively, were considered pathogenic.

All pathogenic/likely pathogenic mutations in patients and noncancer PMC were confirmed by Sanger sequencing and CNVs by MLPA (if available) or by qPCR (protocol available on request), and they were submitted to ClinVar under the submission ID SUB5822876.

#### 4.3. Statistical Analysis

The odds ratio (OR) for particular gene was calculated using Fisher's exact test, and p values  $< 0.05$  were considered significant. The multiple mutation carriers were excluded from the OR calculations. For the identification of other OC candidate genes, the Bonferroni correction was employed. The associations between mutation status and clinicopathological characteristics were estimated using Fisher's exact test, and p values  $< 0.05$  were considered significant.

## 5. Conclusions

Our study demonstrated that nearly one in three OC patients carries a pathogenic mutation in genes significantly associated with OC. The mutation frequency exceeded 10% in all clinicopathological subgroups, regardless of the age at diagnosis, clinical or histopathological characteristics, with an exception of women diagnosed with OC before the age of 30 or with rare histological OC subtypes. Importantly, we found that the high mutation prevalence included borderline tumors justifying genetic testing of all OC patients, including women diagnosed with borderline tumors. Surprisingly, *BRCA1/2* mutations were not associated with sporadic OC in very young women ( $\leq 30$  years). Besides the established OC predisposition genes, *NBN* and *BARD1* were significantly associated with a moderate OC risk; however, further studies will be required to specify the associated OC risk and to identify the value of the detected genetic mutations in terms of disease prognosis and therapy prediction. Hence, analyses of rarely mutated BC/OC predisposition genes that failed to increase OC risk in our study are further warranted to evaluate their association with OC in future larger dataset and/or in frame of international consortia. These should include also other candidate alterations with predictive and/or prognostic potential.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/4/956/s1>, Table S1: the clinicopathological characteristics of 1333 ovarian cancer patients, Table S2: mutation frequencies in ovarian cancer cases and population-matched controls, Table S3: clinical and pathological characteristics in multiple mutation carriers, Table S4: clinicopathological characteristics of mutation carriers in HBOC genes listed in NCCN guidelines (mutation carriers in a group of 1320 ovarian cancer patients (after exclusion of 13 multiple mutation carriers shown in Table S3) (10 genes significantly associated with OC risk in our study are highlighted), Table S5: mutations in 201 additional analyzed genes with associated OC risk (significantly associated genes ( $p < 0.05$ ) are highlighted), Table S6: characteristics of 15 *PPM1D* mutation carriers, and Table S7: clinicopathological characteristics of mutation carriers in *NAT1*, *PPM1D*, and *SHPRH* significantly associated with OC risk.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.S.; data curation, M.V., L.F., and M.K.; funding acquisition, P.K., Z.K., and J.S.; investigation, K.L., L.S., M.J., M.B., M.C., S.J., J.K., Z.V., M.U., P.K., E.M., L.F., J.H., P.V., F.L., M.K., L.C., S.T., J.I., L.H., M.K., R.V., S.K., M.Z., L.M., Z.K., and J.S.; methodology, K.L., Z.K., and J.S.; project administration, J.S.; resources, P.K., R.V., S.K., Z.K., and J.S.; software, P.Z. and V.S.; validation, K.L., L.S., M.J., M.B., M.C., E.M., F.L., S.T., and J.S.; writing—original draft, K.L., Z.K., and J.S.; writing—review and editing, L.S., P.Z., M.V., M.J., M.B., P.K., E.M., L.F., F.L., and L.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Ministry of Health of the Czech Republic [Grant numbers 16-29959A, NV17-32030A, NV18-03-00024, MH CZ – DRO (FNOL, 00098892)] and by the Charles University projects [SVV 260516, PROGRES Q28/LF1, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001634].

**Acknowledgments:** We thank our patients for contribution in this study. We thank our clinical colleagues for their valuable comments to the manuscript and Jan Flemr for language editing.

**Conflicts of Interest:** The authors have declared no conflicts of interest.

## References

1. Levanon, K.; Crum, C.; Drapkin, R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 5284–5293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kim, J.; Park, E.Y.; Kim, O.; Schilder, J.M.; Coffey, D.M.; Cho, C.H.; Bast, R.C., Jr. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, 433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA A Cancer J. Clin.* **2016**, *66*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Walsh, T.; Casadei, S.; Lee, M.K.; Pennil, C.C.; Nord, A.S.; Thornton, A.M.; Roeb, W.; Agnew, K.J.; Stray, S.M.; Wickramanayake, A.; et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 18032–18037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Koczkowska, M.; Krawczynska, N.; Stukan, M.; Kuzniacka, A.; Brozek, I.; Sniadecki, M.; Debniak, J.; Wydra, D.; Biernat, W.; Kozlowski, P.; et al. Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, 442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Krivokuca, A.; Boljevic, I.; Jovandic, S.; Magic, Z.; Mandic, A.; Tomasevic, Z.; Brankovic-Magic, M. Germline mutations in cancer susceptibility genes in high grade serous ovarian cancer in Serbia. *J. Hum. Genet.* **2019**. [[CrossRef](#)]
7. Offit, K. BRCA mutation frequency and penetrance: New data, old debate. *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 1675–1677. [[CrossRef](#)]
8. Norquist, B.M.; Harrell, M.I.; Brady, M.F.; Walsh, T.; Lee, M.K.; Gulsuner, S.; Bernardis, S.S.; Casadei, S.; Yi, Q.; Burger, R.A.; et al. Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol.* **2016**, *2*, 482–490. [[CrossRef](#)]
9. Loveday, C.; Turnbull, C.; Ruark, E.; Xicola, R.M.; Ramsay, E.; Hughes, D.; Warren-Perry, M.; Snape, K.; Breast Cancer Susceptibility, C.; Eccles, D.; et al. Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 475–476, author reply 476. [[CrossRef](#)]
10. Loveday, C.; Turnbull, C.; Ramsay, E.; Hughes, D.; Ruark, E.; Frankum, J.R.; Bowden, G.; Kalmyrzaev, B.; Warren-Perry, M.; Snape, K.; et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 879–882. [[CrossRef](#)]
11. Watson, P.; Butzow, R.; Lynch, H.T.; Mecklin, J.P.; Jarvinen, H.J.; Vasen, H.F.; Madlensky, L.; Fidalgo, P.; Bernstein, I.; International Collaborative Group on, H. The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol. Oncol.* **2001**, *82*, 223–228. [[CrossRef](#)]
12. Ramus, S.J.; Song, H.; Dicks, E.; Tyrer, J.P.; Rosenthal, A.N.; Intermaggio, M.P.; Fraser, L.; Gentry-Maharaj, A.; Hayward, J.; Philpott, S.; et al. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Banno, K.; Kisu, I.; Yanokura, M.; Masuda, K.; Ueki, A.; Kobayashi, Y.; Hirasawa, A.; Aoki, D. Hereditary gynecological tumors associated with Peutz-Jeghers syndrome (Review). *Oncol. Lett.* **2013**, *6*, 1184–1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lilyquist, J.; LaDuca, H.; Polley, E.; Davis, B.T.; Shimelis, H.; Hu, C.; Hart, S.N.; Dolinsky, J.S.; Couch, F.J.; Goldgar, D.E. 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*, 375–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Carter, N.J.; Marshall, M.L.; Susswein, L.R.; Zorn, K.K.; Hiraki, S.; Arvai, K.J.; Torene, R.I.; McGill, A.K.; Yackowski, L.; Murphy, P.D.; et al. Germline pathogenic variants identified in women with ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* **2018**, *151*, 481–488. [[CrossRef](#)]

16. Schubert, S.; van Luttikhuisen, J.L.; Auber, B.; Schmidt, G.; Hofmann, W.; Penkert, J.; Davenport, C.F.; Hille-Betz, U.; Wendeburg, L.; Bublitz, J.; et al. The identification of pathogenic variants in BRCA1/2 negative, high risk, hereditary breast and/or ovarian cancer patients: High frequency of FANCM pathogenic variants. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 2683–2694. [[CrossRef](#)]
17. Daly, M.B.; Pilarski, R.; Berry, M.; Buys, S.S.; Farmer, M.; Friedman, S.; Garber, J.E.; Kauff, N.D.; Khan, S.; Klein, C.; et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **2017**, *15*, 9–20. [[CrossRef](#)]
18. Domchek, S.M.; Friebel, T.M.; Neuhausen, S.L.; Wagner, T.; Evans, G.; Isaacs, C.; Garber, J.E.; Daly, M.B.; Eeles, R.; Matloff, E.; et al. Mortality after bilateral salpingo-oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: A prospective cohort study. *Lancet. Oncol.* **2006**, *7*, 223–229. [[CrossRef](#)]
19. Soukupova, J.; Zemankova, P.; Lhotova, K.; Janatova, M.; Borecka, M.; Stolarova, L.; Lhota, F.; Foretova, L.; Machackova, E.; Stranecky, V.; et al. Validation of CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195761. [[CrossRef](#)]
20. King, M.C.; Marks, J.H.; Mandell, J.B.; New York Breast Cancer Study, G. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* **2003**, *302*, 643–646. [[CrossRef](#)]
21. Rafnar, T.; Gudbjartsson, D.F.; Sulem, P.; Jonasdottir, A.; Sigurdsson, A.; Jonasdottir, A.; Besenbacher, S.; Lundin, P.; Stacey, S.N.; Gudmundsson, J.; et al. Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 1104–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bonache, S.; Esteban, I.; Moles-Fernandez, A.; Tenes, A.; Duran-Lozano, L.; Montalban, G.; Bach, V.; Carrasco, E.; Gadea, N.; Lopez-Fernandez, A.; et al. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2018**, *144*, 2495–2513. [[CrossRef](#)]
23. Lynch, H.T.; de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 919–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lu, H.M.; Li, S.; Black, M.H.; Lee, S.; Hoiness, R.; Wu, S.; Mu, W.; Huether, R.; Chen, J.; Sridhar, S.; et al. Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA Oncol.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kurian, A.W.; Ward, K.C.; Howlader, N.; Deapen, D.; Hamilton, A.S.; Mariotto, A.; Miller, D.; Penberthy, L.S.; Katz, S.J. Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* **2019**, JCO1801854. [[CrossRef](#)]
26. Yang, X.; Leslie, G.; Doroszuk, A.; Schneider, S.; Allen, J.; Decker, B.; Dunning, A.M.; Redman, J.; Scarth, J.; Plaskocinska, I.; et al. Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 674–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kleiblova, P.; Stolarova, L.; Krizova, K.; Lhota, F.; Hojny, J.; Zemankova, P.; Havranek, O.; Vocka, M.; Cerna, M.; Lhotova, K.; et al. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **2019**. [[CrossRef](#)]
28. Harter, P.; Hauke, J.; Heitz, F.; Reuss, A.; Kommoss, S.; Marme, F.; Heimbach, A.; Prieske, K.; Richters, L.; Burges, A.; et al. Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Whitworth, J.; Skytte, A.B.; Sunde, L.; Lim, D.H.; Arends, M.J.; Happerfield, L.; Frayling, I.M.; van Minkelen, R.; Woodward, E.R.; Tischkowitz, M.D.; et al. Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome: A Case Series and Review. *JAMA Oncol.* **2016**, *2*, 373–379. [[CrossRef](#)]
30. Stradella, A.; Del Valle, J.; Rofes, P.; Feliubadalo, L.; Grau Garces, E.; Velasco, A.; Gonzalez, S.; Vargas, G.; Izquierdo, A.; Campos, O.; et al. Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression? *J. Med. Genet.* **2018**. [[CrossRef](#)]
31. Whitworth, J.; Smith, P.S.; Martin, J.E.; West, H.; Luchetti, A.; Rodger, F.; Clark, G.; Carss, K.; Stephens, J.; Stirrups, K.; et al. Comprehensive Cancer-Predisposition Gene Testing in an Adult Multiple Primary Tumor Series Shows a Broad Range of Deleterious Variants and Atypical Tumor Phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **2018**, *103*, 3–18. [[CrossRef](#)]
32. Castera, L.; Harter, V.; Muller, E.; Krieger, S.; Goardon, N.; Ricou, A.; Rousselin, A.; Paimparay, G.; Legros, A.; Bruet, O.; et al. Landscape of pathogenic variations in a panel of 34 genes and cancer risk estimation from 5131 HBOC families. *Genet. Med.* **2018**, *20*, 1677–1686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Morgan, R.D.; Burghel, G.J.; Flaum, N.; Bulman, M.; Clamp, A.R.; Hasan, J.; Mitchell, C.L.; Schlecht, H.; Woodward, E.R.; Lallo, F.I.; et al. Prevalence of germline pathogenic BRCA1/2 variants in sequential epithelial ovarian cancer cases. *J. Med. Genet.* **2019**, *56*, 301–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Plaskocinska, I.; Shipman, H.; Drummond, J.; Thompson, E.; Buchanan, V.; Newcombe, B.; Hodgkin, C.; Barter, E.; Ridley, P.; Ng, R.; et al. New paradigms for BRCA1/BRCA2 testing in women with ovarian cancer: Results of the Genetic Testing in Epithelial Ovarian Cancer (GTEOC) study. *J. Med. Genet.* **2016**, *53*, 655–661. [[CrossRef](#)]
35. Rust, K.; Spiliopoulou, P.; Tang, C.Y.; Bell, C.; Stirling, D.; Phang, T.; Davidson, R.; Mackean, M.; Nussey, F.; Glasspool, R.M.; et al. Routine germline BRCA1 and BRCA2 testing in patients with ovarian carcinoma: Analysis of the Scottish real-life experience. *BJOG* **2018**, *125*, 1451–1458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ruark, E.; Snape, K.; Humburg, P.; Loveday, C.; Bajrami, I.; Brough, R.; Rodrigues, D.N.; Renwick, A.; Seal, S.; Ramsay, E.; et al. Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* **2013**, *493*, 406–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Akbari, M.R.; Lepage, P.; Rosen, B.; McLaughlin, J.; Risch, H.; Minden, M.; Narod, S.A. PPM1D mutations in circulating white blood cells and the risk for ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*, djt323. [[CrossRef](#)]
38. Kleiblova, P.; Shaltiel, I.A.; Benada, J.; Sevcik, J.; Pechackova, S.; Pohlreich, P.; Voest, E.E.; Dunder, P.; Bartek, J.; Kleibl, Z.; et al. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 511–521. [[CrossRef](#)]
39. Pharoah, P.D.P.; Song, H.; Dicks, E.; Intermaggio, M.P.; Harrington, P.; Baynes, C.; Alsop, K.; Australian Ovarian Cancer Study, G.; Bogdanova, N.; Cicek, M.S.; et al. PPM1D Mosaic Truncating Variants in Ovarian Cancer Cases May Be Treatment-Related Somatic Mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108*. [[CrossRef](#)]
40. Hein, D.W.; Fakis, G.; Boukouvala, S. Functional expression of human arylamine N-acetyltransferase NAT1\*10 and NAT1\*11 alleles: A mini review. *Pharm. Genom.* **2018**, *28*, 238–244. [[CrossRef](#)]
41. Butcher, N.J.; Minchin, R.F. Arylamine N-acetyltransferase 1: A novel drug target in cancer development. *Pharm. Rev.* **2012**, *64*, 147–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Seelinger, M.; Otterlei, M. Helicase-Like Transcription Factor HLTf and E3 Ubiquitin Ligase SHPRH Confer DNA Damage Tolerance through Direct Interactions with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Nalepa, G.; Clapp, D.W. Fanconi anaemia and cancer: An intricate relationship. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 168–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhang, L.; Bao, Y.; Riaz, M.; Tiller, J.; Liew, D.; Zhuang, X.; Amor, D.J.; Huq, A.; Petelin, L.; Nelson, M.; et al. Population genomic screening of all young adults in a health-care system: A cost-effectiveness analysis. *Genet. Med.* **2019**. [[CrossRef](#)]
45. Best, A.F.; Tucker, M.A.; Frone, M.N.; Greene, M.H.; Peters, J.A.; Katki, H.A. A Pragmatic Testing-Eligibility Framework for Population Mutation Screening: The Example of BRCA1/2. *Cancer Epidemiol Biomark. Prev.* **2019**, *28*, 293–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Turnbull, C.; Sud, A.; Houlston, R.S. Cancer genetics, precision prevention and a call to action. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 1212–1218. [[CrossRef](#)]
47. Gabai-Kapara, E.; Lahad, A.; Kaufman, B.; Friedman, E.; Segev, S.; Renbaum, P.; Beerli, R.; Gal, M.; Grinshpun-Cohen, J.; Djemal, K.; et al. Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 14205–14210. [[CrossRef](#)]
48. Manchanda, R.; Patel, S.; Gordeev, V.S.; Antoniou, A.C.; Smith, S.; Lee, A.; Hopper, J.L.; MacInnis, R.J.; Turnbull, C.; Ramus, S.J.; et al. Cost-effectiveness of Population-Based BRCA1, BRCA2, RAD51C, RAD51D, BRIP1, PALB2 Mutation Testing in Unselected General Population Women. *J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 714–725. [[CrossRef](#)]
49. George, A.; Kaye, S.; Banerjee, S. Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 284–296. [[CrossRef](#)]
50. Ledermann, J.; Harter, P.; Gourley, C.; Friedlander, M.; Vergote, I.; Rustin, G.; Scott, C.L.; Meier, W.; Shapira-Frommer, R.; Safra, T.; et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: A preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet. Oncol.* **2014**, *15*, 852–861, Correction in **2015**, *16*, e158. [[CrossRef](#)]















51. Chandran, E.A.; Kennedy, I. Significant Tumor Response to the Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib in Heavily Pretreated Patient With Ovarian Carcinosarcoma Harboring a Germline RAD51D Mutation. *JCO Precis. Oncol.* **2018**, 1–4. [[CrossRef](#)]
52. Ngoi, N.Y.L.; Tay, D.; Heong, V.; Thian, Y.L.; Ong, P.Y.; Ow, S.G.W.; Jeyasekharan, A.D.; Lim, Y.W.; Lim, S.E.; Lee, S.C.; et al. Reversal of Bowel Obstruction with Platinum-Based Chemotherapy and Olaparib in Recurrent, Short Platinum-Free Interval, RAD51C Germline Mutation–Associated Ovarian Cancer. *JCO Precis. Oncol.* **2018**, 1–8. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Article

# Low Frequency of Cancer-Predisposition Gene Mutations in Liver Transplant Candidates with Hepatocellular Carcinoma

Klara Horackova <sup>1,†</sup> , Sona Frankova <sup>2,†</sup> , Petra Zemankova <sup>1,3</sup> , Petr Nehasil <sup>1,3,4</sup> , Marta Cerna <sup>1</sup>, Magdalena Neroldova <sup>5</sup> , Barbora Otahalova <sup>1,6</sup> , Jan Kral <sup>1</sup>, Milena Hovhannisyanyan <sup>1</sup>, Viktor Stranecky <sup>4</sup>, Tomas Zima <sup>1</sup>, Marketa Safarikova <sup>1</sup>, Marta Kalousova <sup>1</sup> , CZEKANCA Consortium <sup>1</sup>, Jan Novotny <sup>5,7</sup> , Jan Sperl <sup>2,8</sup>, Marianna Borecka <sup>1</sup>, Sandra Jelinkova <sup>1</sup> , Michal Vocka <sup>9</sup> , Marketa Janatova <sup>1</sup>, Petra Kleiblova <sup>1,7</sup> , Zdenek Kleibl <sup>1,3</sup> , Milan Jirsa <sup>1,5</sup> , and Jana Soukupova <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12808 Prague, Czech Republic
  - <sup>2</sup> Department of Hepatogastroenterology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 14021 Prague, Czech Republic
  - <sup>3</sup> Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12853 Prague, Czech Republic
  - <sup>4</sup> Department of Paediatrics and Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12808 Prague, Czech Republic
  - <sup>5</sup> Centre for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 14021 Prague, Czech Republic
  - <sup>6</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, 12800 Prague, Czech Republic
  - <sup>7</sup> Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12800 Prague, Czech Republic
  - <sup>8</sup> Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and Military University Hospital, 16902 Prague, Czech Republic
  - <sup>9</sup> Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12808 Prague, Czech Republic
- \* Correspondence: jana.soukupova@lf1.cuni.cz; Tel.: +420-22496-4501  
† These authors contributed equally to this work.  
‡ Full consortium membership is listed in the supplementary material (Supplementary Table S1).



**Citation:** Horackova, K.; Frankova, S.; Zemankova, P.; Nehasil, P.; Cerna, M.; Neroldova, M.; Otahalova, B.; Kral, J.; Hovhannisyanyan, M.; Stranecky, V.; et al. Low Frequency of Cancer-Predisposition Gene Mutations in Liver Transplant Candidates with Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* **2023**, *15*, 201. <https://doi.org/10.3390/cancers15010201>

Academic Editor: Dimitrios Moris

Received: 30 November 2022

Revised: 22 December 2022

Accepted: 23 December 2022

Published: 29 December 2022



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth most common cause of cancer-related deaths worldwide. HCC mostly results from liver cirrhosis and its genetic predisposition is believed to be rare. A liver transplantation is considered a curative therapy for HCC; however, de novo tumor development is a feared complication in immunosuppressed transplant recipients. Having analyzed the prevalence of pathogenic/likely pathogenic germline variants in cancer-predisposition genes in 334 HCC patients considered for liver transplantation, we found only 7/334 (2.1%) carriers of pathogenic variants in established cancer-predisposition genes (*PMS2*, *4×NBN*, *FH* or *RET*). Interestingly, two MRN complex genes (*NBN* and *RAD50*) were significantly more frequent among patients over controls. Therefore, we conclude that the genetic predisposition to HCC is rare and HCC does not meet the criteria for routine germline genetic testing; however, germline testing could be considered in liver transplant recipients as the variant carriers may benefit from tailored follow-up or targeted therapy.

**Abstract:** Hepatocellular carcinoma (HCC) mainly stems from liver cirrhosis and its genetic predisposition is believed to be rare. However, two recent studies describe pathogenic/likely pathogenic germline variants (PV) in cancer-predisposition genes (CPG). As the risk of de novo tumors might be increased in PV carriers, especially in immunosuppressed patients after a liver transplantation, we analyzed the prevalence of germline CPG variants in HCC patients considered for liver transplantation. Using the panel NGS targeting 226 CPGs, we analyzed germline DNA from 334 Czech HCC patients and 1662 population-matched controls. We identified 48 PVs in 35 genes in 47/334 patients (14.1%). However, only 7/334 (2.1%) patients carried a PV in an established CPG (*PMS2*, *4×NBN*, *FH* or *RET*). Only the PV carriers in two MRN complex genes (*NBN* and *RAD50*) were significantly more frequent among patients over controls. We found no differences in clinicopathological characteristics between

carriers and non-carriers. Our study indicated that the genetic component of HCC is rare. The HCC diagnosis itself does not meet criteria for routine germline CPG genetic testing. However, a low proportion of PV carriers may benefit from a tailored follow-up or targeted therapy and germline testing could be considered in liver transplant recipients.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma; liver cirrhosis; liver transplantation; genetic predisposition; panel sequencing; MRN complex; germline mutation

## 1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth most frequent cause of cancer-related deaths and the fifth most frequent malignancy globally [1]. With 854,000 new cases and 810,000 deaths annually, HCC represents 7% of all malignancies. Diagnosis of HCC is responsible for 90% of primary liver tumors [2]. Its incidence increases with age and peaks at the age of 70; however, the age at diagnosis is significantly lower in Chinese and black African populations. Males are affected 2–2.5× more often than females. The incidence also varies geographically, with the highest incidence reported in low- and middle-resource countries from Southeastern Asia and Sub-Saharan Africa, accounting for more than 85% of the new global cases of HCC. In Europe, the incidence is significantly lower except for Southern Europe [3].

Approximately 90% of HCC cases occur in cirrhotic liver patients associated with chronic hepatitis B or C; alcoholic or metabolic liver disease, including non-alcoholic steatohepatitis (NASH); hereditary hemochromatosis or alpha-1-antitrypsin deficiency [2]. One-third of patients with liver cirrhosis develop HCC. The annual risk of HCC development in cirrhotic patients is estimated to be 1–8%, depending on the liver disease severity [4,5]. Liver transplantation represents the curative therapy with the best long-term results [6]. The 1-year and 5-year survival rates of liver transplant recipients are 90% and 70%, respectively, with de novo malignancies being the most frequent cause of late mortality in immunosuppressed liver transplant recipients [7]. To reduce mortality, guidelines for prevention and management of de novo tumors have been published recently [6].

In contrast to other cancer types, the hereditary component of HCC is considered rare [8]. However, recently published studies revealed that 11.4–12.6% of HCC patients carried pathogenic/likely pathogenic germline variants (PV) in some cancer-predisposition genes (CPG), including established high-penetrant genes causing hereditary breast/ovarian cancer (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*) or Lynch syndrome (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) [9,10].

We hypothesized that the risk of de novo malignancies after liver transplantation might be increased in immunosuppressed PV carriers in CPGs. To this end, we aimed to identify the prevalence of PV in a retrospective, precisely clinicopathologically characterized single-center cohort of 334 consecutive liver transplant candidates with HCC in this study.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

The study group consisted of 334 HCC patients (258 males and 76 females) referred to the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague as liver transplantation candidates between August 2002 and September 2021. In the majority of patients (329/334, 98.5%), liver cirrhosis was diagnosed in accordance with the diagnostic guidelines before HCC onset [3]. There was no evidence of liver cirrhosis found for only five HCC patients. The etiology of the liver cirrhosis was based on patients' medical history and laboratory data (Table 1).



**Table 1.** Clinicopathological characteristics in all 334 HCC patients.

| Patients' Characteristics  | All Patients<br>N = 334 | Males<br>N = 258 | Females<br>N = 76 |
|--|-------------------------|------------------|-------------------|
| Age [years]; median (range)  | 63 (26–77)              | 63 (36–75)       | 65 (26–77)        |
| Cirrhosis; N (%)   | 329 (98.5)              | 254 (98.4)       | 75 (98.7)         |
| Alcoholic  | 129 (38.6)              | 115 (44.6)       | 14 (18.4)         |
| Viral  | 120 (35.9)              | 77 (29.8)        | 43 (56.6)         |
| Cholestatic and autoimmune   | 48 (14.4)               | 37 (14.3)        | 11 (14.5)         |
| NASH (non-alcoholic steatohepatitis)                                   | 29 (8.7)                | 23 (8.9)         | 6 (7.9)           |
| Metabolic  | 3 (0.9)                 | 2 (0.8)          | 1 (1.3)           |
| Not present  | 5 (1.5)                 | 4 (1.6)          | 1 (1.3)           |
| HCC treatment; N (%)   |                         |                  |                   |
| Liver transplantation  | 299 (89.5)              | 225 (87.2)       | 74 (97.4)         |
| Other  | 35 (10.5)               | 33 (12.8)        | 2 (2.6)           |
| HCC characteristics  |                         |                  |                   |
| AFP [ng/mL]; median (range)  | 8.3 (0.9–5784)          | 7.4 (0.9–5784)   | 15.0 (1.9–1210)   |
| Milan criteria; N (% of known)   | 220 (65.9)              | 168 (65.1)       | 52 (68.4)         |
| Microangioinvasion; N (% of known)                                     | 128 (45.6)              | 91 (43.8)        | 37 (50.7)         |
| Cholangiocarc. differentiation; N (% of known)                         | 18 (5.4)                | 10 (4.6)         | 8 (10.8)          |
| Grade 1; N (% of known)  | 37 (13.0)               | 22 (10.3)        | 15 (21.1)         |
| Grade 2; N (% of known)  | 154 (54.0)              | 123 (57.5)       | 31 (43.7)         |
| Grade 3; N (% of known)  | 94 (33.0)               | 69 (32.2)        | 25 (35.2)         |
| Multiple primary tumor; N (%)  | 57 (17.1)               | 48 (18.7)        | 9 (11.9)          |
| Malignancy in 1 <sup>st</sup> /2 <sup>nd</sup> degree relatives; N (%) | 131 (39.2)              | 99 (38.4)        | 32 (42.1)         |
| Diabetes; N (%)  | 138 (41.3)              | 117 (45.3)       | 21 (27.6)         |
| Obesity (BMI>30); N (%)  | 94 (28.1)               | 80 (31.0)        | 14 (18.4)         |
| Smoking; N (%)   | 192 (57.5)              | 161 (62.4)       | 31 (40.8)         |

Regarding the treatment modalities, 299 patients underwent liver transplantation, 34 patients were referred to palliative oncological therapy or best supportive care, and a single patient underwent liver resection. The median follow-up was 4.2 years (range 0.1–22.2 years). Demographic, laboratory and histopathological data were extracted from the hospital electronic information system. All but two patients were Caucasian of Czech origin, gave written informed consent to storing of their blood samples, and agreed to use of the blood samples for future research, including genetic testing.

## 2.2. Controls

Data from two population-matched control groups were used for germline variant evaluation. For variant prioritization, we used a group of “super-controls” consisting of 791 healthy, non-cancer, older individuals aged >60 years (92 males and 697 females), without personal and first-degree family member cancer history. For case-control analyses, we used an independent control group consisting of 1662 unselected population-matched controls (PMC) provided by the National Center for Medical Genomics (<http://ncmg.cz>, accessed on 1 April 2022), in details described previously [11].

## 2.3. Library Preparation, Sequencing and Bioinformatics

Patients' genomic DNA was isolated from peripheral blood using the Qiagen QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Hilden, Germany). One hundred ng of gDNA was processed for the NGS library preparation using a KAPA HyperPlus Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Briefly, gDNA was enzymatically fragmented for 12.5 min at 37 °C, targeting 200 bp DNA fragments. The preparation of libraries, including the use of in-house-designed adapters and dual index primers used in a six-cycle, ligation-mediated polymerase chain reaction (LM-PCR), as well as the primers subsequently used in post-capture PCR, have been described in Soukupova et al. [12]. The prepared pre-library was eluted to a final volume of 30 µL, checked with a High Sensitivity DNA kit using a Bioanalyzer 2100 (both from Agilent Technologies, Santa

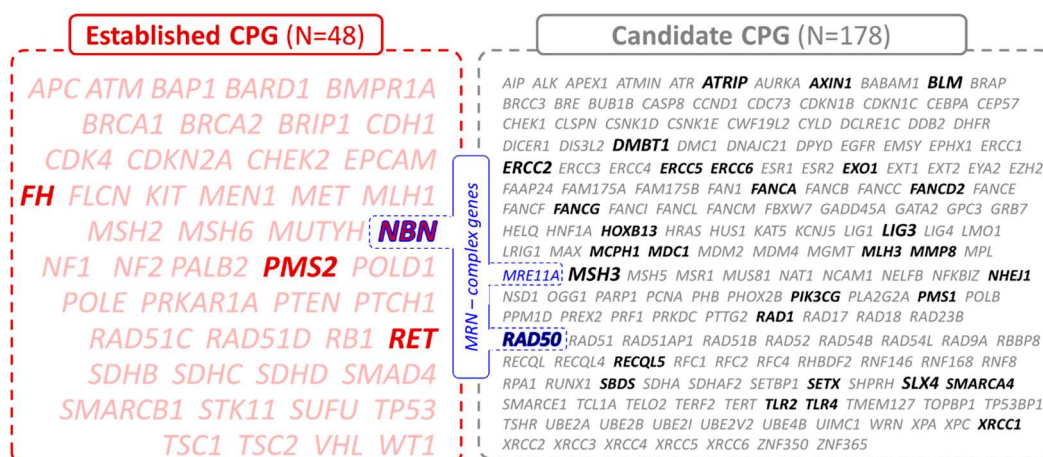
Clara, CA, USA) and quantified with dsDNA High Sensitivity Assay Kits (Qubit assays) using a Qubit Flex Fluorimeter (both from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Seventy-two barcoded samples were equimolarly pooled yielding a 1.5 µg DNA pool in 45 µL volume, concentrated if necessary. Pooled samples were then hybridized at 55 °C for 16–20 h using a KAPA HyperCapture Reagent kit from Roche and a Roche-made custom-designed CZE CANCA (CZEch Cancer paNel for Clinical Application) panel capturing 226 established and candidate CPG [12] (Supplementary Table S2). The post-hybridization clean-up and amplification (in 11 cycles) were performed according to the manufacturer's instructions for <40 Mbp capture target size with minor workflow modifications, including the in-house-designed post-capture PCR primers, as described previously [12]. The final library concentration was measured with the Qubit dsDNA HS Assay Kit and the targeted gene enrichment was checked using qPCR with in-house designed primers (available upon request). Finally, two libraries (each consisting of 72 samples) were proportionally pooled together at a final 1.5 pM concentration and prepared for NextSeq sequencing by adding 0.03 pM PhiX. Sequencing was performed on an Illumina NextSeq 500 instrument using the NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 for 150 cycles (Illumina, San Diego, CA, USA).

The sequencing data stored as FASTQ files were generated from NextSeq using an Illumina BaseSpace Sequence Hub and processed as described in Soukupova et al. [12] with minor upgrades. Briefly, the FASTQ files were mapped to a reference genome hg19 using Novoalign v2.08.03 (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/>, accessed on 1 April 2022), providing the corresponding SAM and afterward BAM files using Picard tools v1.129 (<https://broadinstitute.github.io/picard/>, accessed on 1 April 2022). The BAM files served for identification of single nucleotide variants (SNV), medium-size insertions and deletions (indels), as well as copy number variants (CNV). For SNV analyses, VCF files were generated from the BAM files (following the exclusion of PCR duplicates) using GATK toolkit v3.8.1 (<https://gatk.broadinstitute.org/>, accessed on 1 April 2022) [13] and annotated with SnpEff v4.3 (<https://pcingola.github.io/SnpEff/>, accessed on 1 April 2022) [14]. Medium-sized indels were characterized using Pindel (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>, accessed on 1 April 2022) [15] and CNV were identified with CNVkit (<https://pypi.org/project/CNVkit/>, accessed on 1 April 2022), as described previously [12].

#### 2.4. Variant and Gene Prioritization

The variant prioritization aimed to identify clinically significant PVs. From the raw called variants, we sequentially filtered out variants (i) with low sequencing quality (<150); (ii) localized in repetitive and low-complexity DNA sequences (using RepeatMasker [16]); and (iii) non-coding (3'/5'UTR, downstream/upstream/intergenic/intragenic/deep intronic) variants and in-frame indels. Further, we filtered out variants with low clinical impact including those present (iv) in the group of super-controls with minor allele frequency (MAF) > 0.4%; (v) in the general population (gnomAD, 1000 Genomes Project, NHLBI GO ESP, ExAC databases [17–20]) with MAF > 0.4%; and (vi) interpreted as benign/likely benign (B/LB) by ClinVar [21]. Additionally, we excluded variants (vii) in last exons; (viii) in introns out of conserved splice site (>2 bp from an exon boundary); (ix) synonymous variants and (x) sequencing errors except for known PV. Finally, we filtered out variants without ClinVar interpretation as pathogenic/likely pathogenic, unless they caused premature termination, frameshift or aberrant splicing (1–2 bp from an exon).

Identified PV were confirmed using Sanger sequencing and/or MLPA and divided as (i) variants in established high-to-moderate CPGs (N = 48; including genes with germline variants of probable prognostic or predictive potential) or (ii) candidate CPGs (N = 178; including genes with uncertain prognostic or predictive effects of their germline variants; Figure 1 and Supplementary Table S2).



**Figure 1.** List of 226 cancer-predisposition genes divided into established (N = 48, in red) and candidate (N = 178, in grey) CPGs based on their clinical significance. The genes of the MRN complex are highlighted in blue. The PVs in CPGs highlighted in bold were found in this study.

### 2.5. Statistical Analyses

Student's t-test or the non-parametric Mann–Whitney and Kruskal–Wallis tests were used for continuous data, and categorical data were analyzed using the chi-square test. The survival rates were assessed with Kaplan–Meier analysis and the log-rank test was used to compare survival rates between individual groups. All statistical analyses were two-sided and a *p*-value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 9.3.1 software (GraphPad). Risk scores for PV carriers in HCC patients vs. PMC were calculated as odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI).

## 3. Results

### 3.1. Germline Variants in Established and Candidate CPG

Altogether, 334 patients' DNA samples were sequenced with a mean coverage of 119× enabling reliable copy number variant (CNV) calling. Identified variants were prioritized as described in the Methods section, yielding 48 PV in 35 genes found in 47/334 (14.1%) patients (Table 2). However, only 7/334 (2.1%) patients harbored a PV in 4/48 established high-to-moderate CPGs, including *PMS2*, *NBN*, *FH* and *RET* (Table 2). The most frequent was a frameshift variant c.657del5 (c.657\_661delACAAA) in *NBN* found in four patients. The remaining PVs included a novel 8907 bp deletion affecting exons 11–12 in *PMS2* (Figure 2) and missense PVs in *FH* and *RET*. In 1662 PMCs, we detected four carriers of *PMS2* and *NBN* variants, respectively, two carriers of PVs in *RET* and none in *FH*. However, a statistically significant difference in frequency was observed only for *NBN* (*p* = 0.012; Table 3).

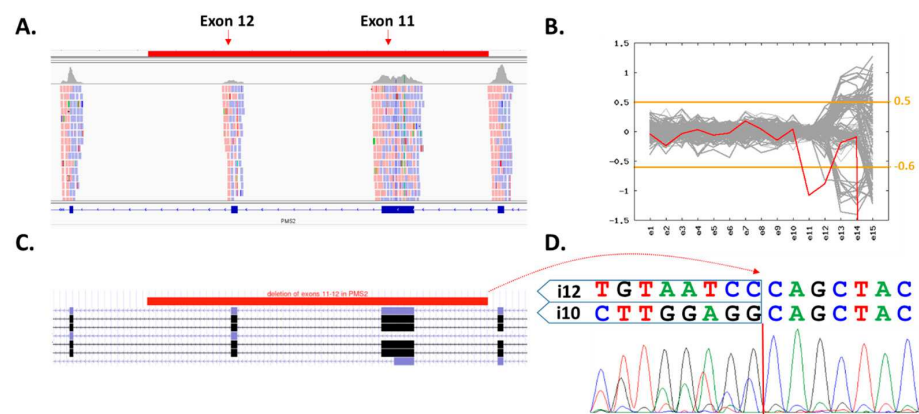
In addition, we detected PVs in 31/178 candidate CPGs in 40/334 (12.0%) patients (including a patient harboring simultaneous germline variants in *ATRIP* and *RAD50*; Table 2). Overall 104/1662 (6.3%) individuals among PMC carried germline variants in these 31 genes (Table 3). Germline variants in HCC patients were recurrently found in only eight candidate genes including *DMBT1*, *RAD50*, *ATRIP*, *BLM*, *ERCC2*, *LIG3*, *MSH3* and *SLX4*; however, only *DMBT1*, *RAD50* and *LIG3* germline variants showed a significant difference in HCC patients compared to PMC (Table 3).

Notably, PVs in seven HCC patients affected the genes coding for proteins of the MRN (MRE11-RAD50-NBN) complex, including four carriers of c.657del5 in *NBN* and three carriers of different variants in *RAD50* (Table 2). PVs in *NBN* and *RAD50* were significantly enriched in analyzed HCC patients over PMC (7/334; 2.1% vs. 7/1662; 0.4%; *p* = 0.001).

**Table 2.** Characterization of PV carriers with HCC in established high-to-moderate (A) and candidate (B) cancer predisposition genes. The PVs were present in the heterozygous state in all carriers.

| Age at HCC Diagnosis (Years), Sex.                                 | Variant                                     | Personal ca History <sup>1</sup> | Family ca History              | Cirrhosis and HCC Features         |
|--|---|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| <b>A. Established high-to-moderate cancer-predisposition genes</b> |   |                                  |                                |                                    |
| 71, F  | <i>PMS2</i> : c.1144+250_2175-1948del8907   | 0                                | 0                              | Viral                              |
| 72, M  | <i>NBN</i> : c.657del5 (p.Lys219fs)         | PrC (post)                       | PrC (father)                   | Alcoholic                          |
| 68, M  | <i>NBN</i> : c.657del5 (p.Lys219fs)         | 0                                | TC (father)                    | Alcoholic                          |
| 68, M  | <i>NBN</i> : c.657del5 (p.Lys219fs)         | PrC (post)                       | 0                              | Autoimmune                         |
| 58, F  | <i>NBN</i> : c.657del5 (p.Lys219fs)         | 0                                | 0                              | Viral, HCC recurrence post-Tx      |
| 53, F  | <i>FH</i> : c.1127A>C (p.Gln376Pro)         | 0                                | 0                              | Viral                              |
| 71, M  | <i>RET</i> : c.2304G>C (p.Glu768Asp)        | CRC (pre)                        | BC (mother); sarcoma (brother) | Alcoholic                          |
| <b>B. Candidate cancer-predisposition genes</b>                    |   |                                  |                                |                                    |
| 69, F  | <i>DMBT1</i> : c.2177-2A>C                  | BC                               | 0                              | Autoimmune                         |
| 66, M  | <i>DMBT1</i> : c.4828+1G>A                  | 0                                | Leu (brother); HNC (brother)   | Alcoholic                          |
| 69, M  | <i>DMBT1</i> : c.4611C>G (p.Tyr1537Ter)     | 0                                | H&N (brother)                  | Alcoholic                          |
| 71, M  | <i>RAD50</i> : c.1875C>G (p.Tyr625Ter)      | PrC (post)                       | BC (mother)                    | Viral                              |
| 65, M  | <i>RAD50</i> : c.2043delC (p.Val683fs)      | 0                                | 0                              | Autoimmune                         |
| 65, M  | <i>RAD50</i> : c.2521del9 (p.Thr841fs) *    | 0                                | 0                              | Viral, HCC recurrence post-Tx      |
| 65, M  | <i>ATRIP</i> : c.1870del2 (p.Cys624fs)      | 0                                | 0                              | Viral, HCC recurrence post-Tx      |
| 61, F  | <i>ATRIP</i> : c.1152del4 (p.Gly385fs) *    | 0                                | 0                              | Autoimmune                         |
| 65, M  | <i>BLM</i> : c.1642C>T (p.Gln548Ter)        | 0                                | LC (father)                    | Non-cirrhotic                      |
| 64, M  | <i>BLM</i> : c.1642C>T (p.Gln548Ter)        | 0                                | 0                              | Autoimmune                         |
| 68, M  | <i>ERCC2</i> : c.2150C>G (r.2144_2190del45) | 0                                | 0                              | Autoimmune                         |
| 53, M  | <i>ERCC2</i> : c.2150C>G (r.2144_2190del45) | 0                                | 0                              | Viral, HCC recurrence post-Tx      |
| 71, F  | <i>LIG3</i> : c.1283delT (p.His428fs)       | 0                                | 0                              | Viral, HCC recurrence post-Tx      |
| 77, F  | <i>LIG3</i> : c.799C>T (p.Arg267Ter)        | 0                                | LC (father)                    | Non-cirrhotic                      |
| 68, M  | <i>MSH3</i> : c.2686G>T (p.Gly896Ter)       | 0                                | Mel (mother)                   | Alcoholic                          |
| 66, M  | <i>MSH3</i> : c.1480delA (p.Asn494fs)       | 0                                | 0                              | Alcoholic                          |
| 66, F  | <i>SLX4</i> : c.4207G>T (p.Glu1403Ter)      | SkC (post)                       | 0                              | Viral                              |
| 58, M  | <i>SLX4</i> : c.4024delA (p.Ser1342fs)      | 0                                | GaC (mother)                   | Autoimmune                         |
| 57, F  | <i>AXIN1</i> : c.64C>T (p.Arg22Ter)         | 0                                | 0                              | Viral                              |
| 62, M  | <i>ERCC5</i> : c.3285del10 (p.Ser1096fs)    | 0                                | 0                              | Viral, HCC recurrence post-Tx      |
| 71, M  | <i>ERCC6</i> : c.537T>A (p.Tyr179Ter)       | 0                                | 0                              | Viral                              |
| 61, M  | <i>EXO1</i> : c.1578del2 (p.Asp526fs)       | CRC (pre)                        | 0                              | NASH                               |
| 60, F  | <i>FANCA</i> : del16-17                     | 0                                | 0                              | NASH                               |
| 59, M  | <i>FANCD2</i> : c.990-1G>A                  | Leu (post)                       | GaC (mother)                   | NASH                               |
| 60, F  | <i>FANCG</i> : c.313G>T (p.Glu105Ter)       | 0                                | H&N (father); HCC (mother)     | NASH                               |
| 64, M  | <i>HOXB13</i> : c.251G>A (p.Gly84Glu)       | 0                                | 0                              | Autoimmune                         |
| 59, M  | <i>MCPH1</i> : c.126del2 (p.Phe43fs)        | 0                                | BC (mother)                    | Autoimmune, HCC recurrence post-Tx |
| 57, M  | <i>MDC1</i> : c.6081delC (p.Ser2028fs)      | 0                                | 0                              | Alcoholic                          |
| 40, M  | <i>MMP8</i> : c.460G>T (p.Gly154Ter)        | 0                                | 0                              | Viral                              |
| 61, M  | <i>MLH3</i> : c.3393dup2 (p.Thr1132fs)      | 0                                | BC (mother)                    | Autoimmune, HCC recurrence post-Tx |
| 59, F  | <i>NHEJ1</i> : c.169C>T (p.Arg57Ter)        | 0                                | HCC (mother)                   | Alcoholic                          |
| 65, M  | <i>PIK3CG</i> : c.2519del2 (p.Gln840fs)     | H&N; SkC; PrC (all pre)          | LC (father)                    | Alcoholic                          |
| 54, M  | <i>PMS1</i> : c.1009insA (p.Tyr337fs)       | 0                                | 0                              | Viral                              |
| 60, M  | <i>RAD1</i> : c.168del5 (p.Lys57fs)         | 0                                | 0                              | Alcoholic                          |
| 41, F  | <i>RECQL5</i> : c.2308C>T (p.Arg770Ter)     | 0                                | RCC (mother)                   | Viral                              |
| 73, F  | <i>SBD5</i> : c.258+2T>C                    | 0                                | 0                              | Viral                              |
| 69, M  | <i>SETX</i> : c.5074dup2 (p.Leu1692fs)      | 0                                | LC (father)                    | NASH                               |
| 59, M  | <i>SMARCA4</i> : c.859+1G>A                 | 0                                | 0                              | Viral                              |
| 69, M  | <i>TLR2</i> : c.1339C>T (p.Arg447Ter)       | Lym (pre)                        | HCC (father)                   | Viral                              |
| 74, M  | <i>TLR4</i> : c.261-1G>C                    | 0                                | BC (mother)                    | NASH                               |
| 45, F  | <i>XRCC1</i> : c.406dupT (p.Tyr136fs)       | 0                                | BC (mother)                    | Alcoholic                          |

<sup>1</sup> pre-/post- HCC diagnosis; \* double variant carrier. Abbreviations: BC: breast cancer; ca: cancer; CRC: colorectal cancer; F: female; GaC: gastric cancer; H&N: head and neck cancer; HCC: hepatocellular carcinoma; Leu: leukemia; Lym: lymphoma; LC: lung cancer; M: male; Mel: melanoma; NASH: non-alcoholic steatohepatitis; PrC: prostate cancer; RCC: renal cell carcinoma; SkC: skin cancer except melanoma; TC: testicular cancer; Tx: transplantation.



**Figure 2.** Characterization of exons 11–12 (8907 bp) PMS2 deletion. (A) Integrated Genome Viewer (IGV) visualization of the coverage decrease suggesting a presence of heterozygous two-exon deletion (highlighted region in red). (B) Visualization of CNV analyses generated using the CNVkit (patient's sample in red). The inconsistent region covering exons 12–15 contains numerous PMS2 pseudogenes. (C) Schematic region of deletion in UCSC genome browser. (D) Characterization of the deletion breakpoint with Sanger sequencing.

**Table 3.** Germline PV identified in A. established high-to-moderate and B. candidate cancer predisposition genes. Statistically significant differences between variant frequencies of patients and controls are highlighted in bold.

| Gene   | Carriers in<br>334 Patients; N (%) | Carriers in<br>1662 PMC; N (%) | Odds Ratio<br>(95% Confidence<br>Interval) | p-Value      |
|--|------------------------------------|--------------------------------|--|--------------|
| <b>A. Established high-to-moderate cancer-predisposition genes</b> |                                    |                                |  |              |
| <i>PMS2</i>  | 1 (0.3)                            | 4 (0.3)                        | 1.2 (0.14–11.11)                           | 0.8          |
| <i>NBN</i>   | <b>4 (1.2)</b>                     | <b>4 (0.3)</b>                 | <b>5.0 (1.25–20.17)</b>                    | <b>0.012</b> |
| <i>FH</i>  | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>RET</i>   | 1 (0.3)                            | 2 (0.1)                        | 2.5 (0.23–27.49)                           | 0.4          |
| All carriers.  | 7 (2.1)                            | 10 (0.6) <sup>1</sup>          |  |              |
| <b>B. Candidate cancer-predisposition genes</b>                    |                                    |                                |  |              |
| <i>DMBT1</i>   | <b>3 (0.9)</b>                     | <b>2 (0.1)</b>                 | <b>7.5 (1.25–45.13)</b>                    | <b>0.010</b> |
| <i>RAD50</i> <sup>2</sup>  | <b>3 (0.9)</b>                     | <b>3 (0.2)</b>                 | <b>5.0 (1.01–24.90)</b>                    | <b>0.029</b> |
| <i>ATRIP</i> <sup>2</sup>  | 2 (0.6)                            | 3 (0.2)                        | 3.3 (0.56–19.98)                           | 0.2          |
| <i>BLM</i>   | 2 (0.6)                            | 7 (0.4)                        | 1.4 (0.30–6.87)                            | 0.7          |
| <i>ERCC2</i>   | 2 (0.6)                            | 8 (0.5)                        | 1.2 (0.26–5.88)                            | 0.8          |
| <i>LIG3</i>  | <b>2 (0.6)</b>                     | <b>1 (0.1)</b>                 | <b>10.0 (0.91–110.48)</b>                  | <b>0.021</b> |
| <i>MSH3</i>  | 2 (0.6)                            | 6 (0.4)                        | 1.7 (0.33–8.26)                            | 0.5          |
| <i>SLX4</i>  | 2 (0.6)                            | 2 (0.1)                        | 5.0 (0.70–35.56)                           | 0.1          |
| <i>AXIN1</i>   | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>ERCC5</i>   | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>ERCC6</i>   | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>EXO1</i>  | 1 (0.3)                            | 2 (0.1)                        | 2.5 (0.23–27.49)                           | 0.4          |
| <i>FANCA</i>   | 1 (0.3)                            | 7 (0.4)                        | 0.7 (0.09–5.77)                            | 0.7          |
| <i>FANCD2</i>  | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>FANCG</i>   | 1 (0.3)                            | 2 (0.1)                        | 2.5 (0.23–27.49)                           | 0.4          |
| <i>HOXB13</i>  | 1 (0.3)                            | 4 (0.3)                        | 1.2 (0.14–11.14)                           | 0.8          |
| <i>MCPH1</i>   | 1 (0.3)                            | 10 (0.6)                       | 0.5 (0.06–3.88)                            | 0.5          |
| <i>MDC1</i>  | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>MLH3</i>  | 1 (0.3)                            | 1 (0.1)                        | 5.0 (0.31–79.75)                           | 0.2          |
| <i>MMP8</i>  | 1 (0.3)                            | 5 (0.3)                        | 1.0 (0.12–8.52)                            | 0.9          |
| <i>NHEJ1</i>   | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>PIK3CG</i>  | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>PMS1</i>  | 1 (0.3)                            | 2 (0.1)                        | 2.5 (0.23–27.49)                           | 0.4          |
| <i>RAD1</i>  | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>RECQL5</i>  | 1 (0.3)                            | 6 (0.4)                        | 0.8 (0.10–6.89)                            | 0.9          |
| <i>SBDS</i>  | 1 (0.3)                            | 13 (0.8)                       | 0.4 (0.05–2.91)                            | 0.3          |
| <i>SETX</i>  | 1 (0.3)                            | 10 (0.6)                       | 0.5 (0.06–3.88)                            | 0.5          |
| <i>SMARCA4</i>   | 1 (0.3)                            | 0                              | n.d.                                       | n.d.         |
| <i>TLR2</i>  | 1 (0.3)                            | 1 (0.1)                        | 5.0 (0.31–79.75)                           | 0.2          |
| <i>TLR4</i>  | 1 (0.3)                            | 2 (0.1)                        | 2.5 (0.23–27.49)                           | 0.4          |
| <i>XRCC1</i>   | 1 (0.3)                            | 7 (0.4)                        | 0.7 (0.09–5.77)                            | 0.7          |
| All carriers   | 40 (12.0)                          | 104 (6.3) <sup>1</sup>         | -  | -            |

<sup>1</sup> only frequency of germline variants in genes found in HCC group is shown. <sup>2</sup> a patient carrying simultaneous *RAD50* and *ATRIP* germline variant. n.d.: not defined. Statistically significant differences between variant frequencies of patients and controls are highlighted in bold.

### 3.2. Clinical Characterization of PV Carriers

Patients with PVs in established CPGs, candidate CPGs, or in MRN complex genes differed from the variant non-carriers neither in demographic characteristics (age, cause of cirrhosis or occurrence of HCC in non-cirrhotic liver, diabetes or obesity), nor in tumor characteristics (angioinvasion, cholangiogenic differentiation, recurrence after liver transplantation). Moreover, the variant carriers did not present an increased frequency of multiple primary tumors (either before or after the liver transplantation) or a higher rate of primary malignancies in their first-degree relatives (Supplementary Table S3). The survival of patients was comparable between non-carriers and carriers of established CPG, candidate CPG and MRN genes (Supplementary Figure S1).

## 4. Discussion

In this single-center study, we performed germline genetic testing on 334 patients with HCC indicated for liver transplants. PVs in the analyzed genes were found in 47/334 (14.1%) patients; however, only 7/334 patients (2.1%) carried a PV in established high-to-moderate CPGs. Of these genes, only variants in *FH* can be considered as high-penetrant and were previously described in HCC patients [10]. Moreover, *NBN* was the most frequently altered gene (Table 3) with four identified carriers of a recurrent Slavic c.657del5 variant [22] that moderately increases the risk of various cancer types in our population [11,23]. The *NBN* gene encodes for a protein stabilizing the MRN complex that regulates double-stranded DNA break repair [24]. Interestingly, we also identified three HCC patients who carried a PV in *RAD50* encoding another MRN complex protein. Thus, in total, seven (2.1%) HCC patients carried a PV in MRN complex genes compared to only 7/1662 (0.4%) controls ( $p = 0.001$ ). While PV carriers in *NBN* and *RAD50* were observed also in previous HCC studies (Table 4), none was found in *MRE11*, the third gene of the MRN complex; however, its germline variants are rare [25]. Interestingly, germline variants in *NBN* were linked to HCC susceptibility in cirrhotic patients with chronic HBV infection previously [26,27]. In animal models, an increased formation of liver tumors was observed in mice hemizygous for the *Nbn* gene [28]. These findings suggest the possible involvement of the MRN complex in HCC development; however, further research, including mechanistic studies of HCC pathogenesis and large analyses in HCC patients are required.

The overall frequency of PV carriers in our HCC patients (14.1%) corresponds to the results published previously (Table 4) by Mezina et al. [10], who identified 25/217 (11.5%) carriers in prospective and 30/219 (13.7%) in retrospective cohorts of HCC patients. Another small study by Uson Junior et al. identified seven (15.9%) PVs in a set of 44 HCC patients [9]. However, the panel of genes analyzed in these studies varied, with ours being the largest (Table 4). The proportion of deleterious variants declined when only PVs in high-to-moderate CPGs were considered (Table 4). However, unlike ours, Mezina et al.'s retrospective study identified nine patients with germline *BRCA1/BRCA2* variants (entirely absent in our cohort) and four patients with germline alterations in Lynch syndrome genes.

The varying frequencies of PV carriers (2.1–11.4%) in high-to-moderate CPGs in the abovementioned studies reflect different enrollment criteria and diverse characteristics of the HCC cohorts. While HCC patients in three studies (this report, the prospective arm of Mezina et al.'s study, and Uson Junior et al.'s study) were first enrolled and germline genetic testing was performed subsequently, individuals with the HCC diagnosis were selected retroactively from a large dataset of patients (analyzed in the commercial laboratory; Invitae) in the retrospective arm of the study by Mezina et al. Prospective studies were characterized by a low frequency of PVs in the genes conferring high overall cancer risk (*APC*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, Lynch syndrome genes) that are routinely tested for hereditary cancer syndromes (Table 4). In contrast, carriers of PVs in such genes were enriched in the retrospective (Invitae) cohort in Mezina et al.'s study [10]. We speculate that the HCC diagnosis among carriers from this retrospective cohort may represent a confounding event in individuals with HCC risk factors (alcohol abuse, HBV/HCV infections, etc.). Additionally, compared to our data (Supplementary Table S3), the HCC patients in Mezina

et al.'s study are characterized by a high frequency of individuals with second primary tumors (17.1 vs. 38.4% in the prospective study) and a high frequency of analyzed patients with positive family cancer history (39.2 vs. over 80% in both prospective and retrospective studies). Also, the retrospective study of Mezina and colleagues included an unusual proportion of female patients compared to their prospective study and our report (56.2 vs. 16.8 and 22.6%, respectively). Moreover, it is possible that the proportion of PV carriers in highly penetrant genes in our study is artificially lower due to the potential early onset of their first cancer before HCC (median age of our cohort is 63 years). Thus, these PV carriers would develop HCC as their second tumor and, hence, they would not be eligible for liver transplantation, referred to the specialized tertiary care center and included in our study.

**Table 4.** Comparison of germline panel studies in HCC patients. The table describes only genes that were analyzed in at least two cohorts and where a carrier of heterozygous PV was found. Established high-to-moderate cancer predisposition genes are highlighted in bold letters.

|  | This Study;<br>N (%) | Uson Junior et al. 2022<br>(Ref. [9]); N (%) | Mezina et al. 2021 (Prospective)<br>(Ref. [10]); N (%) | Mezina et al. 2021<br>(Retrospective)<br>(Ref. [10]); N (%) |
|--|----------------------|--|--|---|
| HCC patients analyzed (N)                      | 334                  | 44   | 217  | 219   |
| Genes analyzed (N)                             | 226                  | 83   | 134  | 1–154   |
| <i>APC</i>                                     | 0                    | 0  | 0  | 2 (0.91)  |
| <i>ATM</i>                                     | 0                    | 0  | 0  | 1 (0.46)  |
| <b><i>BARD1</i></b>                            | 0                    | 1 (2.27)                                     | 0  | 1 (0.46)  |
| <i>BLM</i>                                     | 2 (0.59)             | 0  | 0  | 0   |
| <b><i>BRCA1</i></b>                            | 0                    | 0  | 0  | 1 (0.46)  |
| <b><i>BRCA2</i></b>                            | 0                    | 0  | 2 (0.92)   | 6 (2.74)  |
| <b><i>BRIP1</i></b>                            | 0                    | 0  | 4 * (1.84)   | 1 (0.46)  |
| <i>CDKN2A</i>                                  | 0                    | 1 (2.27)                                     | 0  | 0   |
| <b><i>CHEK2</i></b>                            | 0                    | 0  | 3 * (1.38)   | 2 (0.91)  |
| <i>FANCA</i>                                   | 1 (0.29)             | n.a.   | 5 (2.30)   | 1 (0.46)  |
| <i>FANCD2</i>                                  | 1 (0.29)             | n.a.   | 2 (0.92)   | 0   |
| <i>FANCG</i>                                   | 1 (0.29)             | n.a.   | 0  | 0   |
| <i>FANCM</i>                                   | 0                    | n.a.   | 1 * (0.46)   | 0   |
| <b><i>FH</i></b>                               | 1 (0.29)             | 0  | 0  | 2 (0.91)  |
| <i>HOXB13</i>                                  | 1 (0.29)             | 0  | 0  | 0   |
| <i>MITF</i>                                    | n.a.                 | 1 (2.27)                                     | 1 * (0.46)   | 1 (0.46)  |
| <i>MLH3</i>                                    | 1 (0.29)             | n.a.   | 0  | 0   |
| <b><i>MSH2</i></b>                             | 0                    | 0  | 0  | 2 (0.91)  |
| <i>MSH3</i>                                    | 2 (0.59)             | n.a.   | 1 * (0.46)   | 0   |
| <b><i>MSH6</i></b>                             | 0                    | 0  | 1 (0.46)   | 0   |
| <i>MUTYH</i>                                   | 0                    | 0  | 3 (1.38)   | 2 (0.91)  |
| <b><i>NBN</i></b>                              | 4 (1.19)             | 2 (4.54)                                     | 0  | 2 (0.91)  |
| <i>NF1</i>                                     | 0                    | 0  | 1 (0.46)   | 0   |
| <i>NTHL1</i>                                   | n.a.                 | 0  | 0  | 1 (0.46)  |
| <b><i>PALB2</i></b>                            | 0                    | 0  | 0  | 3 (1.37)  |
| <b><i>PMS2</i></b>                             | 1 (0.29)             | 0  | 1 (0.46)   | 0   |
| <b><i>RAD50</i></b>                            | 3 * (0.89)           | 1 (2.27)                                     | 1 (0.46)   | 0   |
| <b><i>RAD51D</i></b>                           | 0                    | 1 (2.27)                                     | 0  | 0   |
| <b><i>RET</i></b>                              | 1 (0.29)             | 0  | 0  | 0   |
| <i>SLX4</i>                                    | 2 (0.59)             | n.a.   | 0  | 0   |
| <i>SMARCA4</i>                                 | 1 (0.29)             | 0  | 0  | 0   |
| <i>TMEM127</i>                                 | 0                    | 0  | 1 * (0.46)   | 0   |
| <b><i>TP53</i></b>                             | 0                    | 0  | 0  | 2 (0.91)  |
| <b>Established PV carriers in CPG *</b>        | 7 (2.1)              | 5 (11.4)                                     | 12 (5.5)   | 25 (11.4)   |
| <b>All carriers (referred in the study; N)</b> | 47 (14.1)            | 7 (15.9)                                     | 25 (11.5)  | 30 (13.7)   |

n.a.—not analyzed; \* double-variant carrier of *RAD50* and *ATRIP* (not shown in this table) in this study (Table 2); *CHEK2* and *BRIP1*, *FANCM* and *TMEM127*, *MITF* and *MSH3* in [8]. Established high-to-moderate cancer predisposition genes are highlighted in bold letters.

For additional evidence, we looked for HCC patients from the Czech CZE CANCA consortium database [29]. Among 10,480 cancer patients, we identified 20 individuals with HCC diagnosis of which two were PV carriers in established CPGs (*BRCA1* and *CHEK2*; Supplementary Table S4). These findings resemble results from Mezina et al.'s retrospective study [10] indicating that PVs in HCC patients are likely found incidentally and can hardly be considered a genetic cause of HCC. It is of note that the risk for HCC development has not been estimated (or even documented) for any of the CPGs mentioned in this report. The

results of our study support previous assumptions expecting a low hereditary component of HCC.

Mezina et al. also suggested germline variants in *FANCA* and *BRIP1* as candidates for HCC susceptibility. While the frequency of *FANCA* variants was comparable among our HCC patients and PMC, *BRIP1* variants were not detected in our study. Moreover, we found rare germline variants in *PMS1* [30], and other DNA damage response (DDR) genes *ERCC2* and *XRCC1* (associated with an increased risk of liver cirrhosis and its potential transformation into HCC in HBV-positive patients) [26,27], but we failed to identify PVs in other CPGs (including *BAP1*, *DICER1*, *HNFI1A*, *MET*, *TERT* and *VHL*) associated with HCC in other studies [31–36].

Concerning the clinicopathological characteristics, only 5/334 individuals in our cohort developed HCC in the non-cirrhotic liver, corresponding to an expected causal effect of cirrhosis on HCC development. None of the non-cirrhotic patients carried a PV in the analyzed genes. Due to the low overall frequency of variant carriers, we did not notice any considerable differences in the carriers' clinicopathological or tumor characteristics compared to the non-carriers.

Despite the low frequency of germline variants, germline genetic testing of HCC patients could be a prospect for precision medicine or targeted therapy. The PV carriers in Lynch syndrome genes and *BRCA1/BRCA2* could benefit from treatment with immune checkpoint (PD-1/PD-L1 inhibitors) and PARP (PARPi) inhibitors, respectively [9,10]. Moreover, a widening PARPi indication could include the PV carriers in the MRN complex and/or other DDR genes [37]. Genetic testing might be of particular importance in a subgroup of HCC patients indicated for liver transplantation. The high lifetime cancer risk in PV carriers in CPGs could strongly accelerate the development of de novo tumors in immunosuppressed transplant recipients. Several such cases have been reported in individuals with various organ transplantation episodically [38–42], but a systematic study in liver transplantation recipients is still missing. Our study indicates that a larger cohort of HCC patients indicated for liver transplantation will be required to perform such analysis due to the low frequency of PV carriers in CPGs among the patients. However, it must be stressed that genetic testing results must not influence liver transplantation eligibility.

The strength of this study includes the rigorous enrollment of well-characterized HCC patients unbiased from the recruitment of patients indicated for germline genetic testing. The study was limited by the predominance of younger liver transplant candidates with less advanced HCC, complying with the criteria for liver transplantation. The germline genetic testing was limited to the 226 cancer-predisposition genes included in the CZECANCA panel, which was designed for the analysis of cancer predisposition but does not cover some of the known cirrhosis-predisposing genes (i.e., *APOB*, *HFE*, *PNPLA3*, *SERPINA1*) [43–47].

## 5. Conclusions

We conclude that the low overall prevalence of PV carriers makes germline genetic testing in HCC diagnosis rather unnecessary unless the patients fulfil other criteria for germline genetic testing (including the presence of indicative second primary tumors or positive family cancer history). However, germline genetic testing might be considered for liver transplant recipients to reduce late mortality from de novo malignancies.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15010201/s1>, Figure S1: Survival of variant carriers in (A) established genes, (B) candidate genes, (C) MRN genes compared to non-carriers, Table S1: List of CZECANCA consortium members; Table S2: List of 226 genes included in the CZECANCA panel (and used transcription variants), divided into two groups based on their clinical significance; Table S3: Clinicopathological characteristics in 334 HCC patients' subgroups of carriers of PVs in cancer-predisposition genes (any CPG) and non-carriers (None); Table S4: Characterization of HCC patients from retrospective CZECANCA consortium database.



**Author Contributions:** K.H.: Investigation; Formal analysis and data curation; Writing—Original Draft. S.F.: Resources; Investigation; Formal analysis and data curation; Writing—Original Draft. P.Z.: Formal analysis and data curation; Software; Writing—Review & Editing. P.N.: Formal analysis and data curation; Software. M.C.: Investigation. M.N.: Resources. B.O.: Investigation. J.K.: Investigation. M.H.: Investigation. V.S.: Resources; Investigation. T.Z.: Resources; Funding acquisition. M.S.: Resources. M.K.: Resources. C.C.: Resources; Investigation. J.N.: Investigation; Writing—Review & Editing. J.S. (Jan Sperl): Conceptualization and methodology; Resources; Funding acquisition; Writing—Review & Editing. M.B.: Investigation; Writing—Review & Editing. S.J.: Investigation. M.V.: Writing—Review & Editing. M.J. (Marketa Janatova): Investigation. P.K.: Conceptualization and methodology; Investigation; Formal analysis and data curation; Funding acquisition; Writing—Review & Editing. Z.K.: Conceptualization and methodology; Resources; Investigation; Formal analysis and data curation; Funding acquisition; Writing—Original Draft. M.J. (Milan Jirsa): Conceptualization and methodology; Resources; Funding acquisition; Writing—Review & Editing. J.S. (Jana Soukupova): Investigation; Formal analysis and data curation; Writing—Review & Editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work has been supported by Ministry of Health of the Czech Republic: NU20-03-00285; Ministry of Health of the Czech Republic: NU20-03-00283; Ministry of Health of the Czech Republic: RVO-VFN 00064165; Ministry of Health of the Czech Republic: RVO-IKEM 00023001; Charles University: COOPERATIO; Charles University: SVV260516; Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic: LX22NPO05102.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Thomayer’s Hospital and the Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic (protocol code G14-08-51; date of approval 13 August 2014).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data generated and analyzed in this study are included in this publication. Identified variants were submitted to ClinVars under accession no. SCV002569169–SCV002569175, or are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** We thank Lucie Budisova for her excellent technical assistance and the National Center for Medical Genomics (<http://ncmg.cz>, accessed on 1 April 2022) for their provision of PMC sequencing data.

**Conflicts of Interest:** Z.K. declares research funding from Roche, unrelated to the project. No other potential conflicts of interest were reported. We declare that the results summarized in this manuscript have not been published previously and have not been submitted for consideration to any other journal.

## Abbreviations

|       |   |
|-------|---|
| CI    | confidence interval                           |
| CNV   | copy number variants                          |
| CPG   | cancer-predisposition genes                   |
| DDR   | DNA damage repair                             |
| HBV   | hepatitis B virus                             |
| HCC   | hepatocellular carcinoma                      |
| HCV   | hepatitis C virus                             |
| MAF   | minor allele frequency                        |
| MRN   | MRE11-RAD50-NBN                               |
| NASH  | non-alcoholic steatohepatitis                 |
| OR    | odds ratio                                    |
| PARPi | PARP1 inhibitors                              |
| PV    | pathogenic/likely pathogenic germline variant |
| PMC   | population-matched controls                   |

## References

1. Yang, J.D.; Hainaut, P.; Gores, G.J.; Amadou, A.; Plymoth, A.; Roberts, L.R. A global view of hepatocellular carcinoma: Trends, risk, prevention and management. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 589–604. [CrossRef]
2. Akinyemiju, T.; Abera, S.; Ahmed, M.; Alam, N.; Alemayohu, M.A.; Allen, C.; Al-Raddadi, R.; Alvis-Guzman, N.; Amoako, Y.; Artaman, A.; et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies from 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 1683–1691.
3. European Association For The Study of The Liver; European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **2012**, *56*, 908–943. [CrossRef]
4. Sangiovanni, A.; Prati, G.M.; Fasani, P.; Ronchi, G.; Romeo, R.; Manini, M.; Del Ninno, E.; Morabito, A.; Colombo, M. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* **2006**, *43*, 1303–1310. [CrossRef]
5. van der Meer, A.J.; Veldt, B.J.; Feld, J.J.; Wedemeyer, H.; Dufour, J.F.; Lammert, F.; Duarte-Rojo, A.; Heathcote, E.J.; Manns, M.P.; Kuske, L.; et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA* **2012**, *308*, 2584–2593. [CrossRef]
6. Colmenero, J.; Tabrizian, P.; Bhangui, P.; Pinato, D.J.; Rodriguez-Peralvarez, M.L.; Sapisochin, G.; Bhoori, S.; Pascual, S.; Senzolo, M.; Al-Adra, D.; et al. De Novo Malignancy after Liver Transplantation: Risk Assessment, Prevention, and Management-Guidelines From the ILTS-SETH Consensus Conference. *Transplantation* **2022**, *106*, e30–e45. [CrossRef]
7. Daniel, K.E.; Eickhoff, J.; Lucey, M.R. Why do patients die after a liver transplantation? *Clin. Transpl.* **2017**, *31*, e12906. [CrossRef]
8. Ozturk, M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin. Liver Dis.* **1999**, *19*, 235–242. [CrossRef]
9. Uson Junior, P.L.; Kunze, K.L.; Golafshar, M.A.; Riegert-Johnson, D.; Boardman, L.; Borad, M.J.; Ahn, D.; Sonbol, M.B.; Faigel, D.O.; Fukami, N.; et al. Germline Cancer Susceptibility Gene Testing in Unselected Patients with Hepatobiliary Cancers: A Multi-Center Prospective Study. *Cancer Prev. Res.* **2022**, *15*, 121–128. [CrossRef]
10. Mezina, A.; Philips, N.; Bogus, Z.; Erez, N.; Xiao, R.; Fan, R.; Olthoff, K.M.; Reddy, K.R.; Samadder, N.J.; Nielsen, S.M.; et al. Multigene Panel Testing in Individuals With Hepatocellular Carcinoma Identifies Pathogenic Germline Variants. *JCO Precis. Oncol.* **2021**, *5*, 988–1000. [CrossRef]
11. Lhotova, K.; Stolarova, L.; Zemankova, P.; Vocka, M.; Janatova, M.; Borecka, M.; Cerna, M.; Jelinkova, S.; Kral, J.; Volkova, Z.; et al. Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 956. [CrossRef] [PubMed]
12. Soukupova, J.; Zemankova, P.; Lhotova, K.; Janatova, M.; Borecka, M.; Stolarova, L.; Lhota, F.; Foretova, L.; Machackova, E.; Stranecky, V.; et al. Validation of CZECA NCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195761. [CrossRef] [PubMed]
13. McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, A.; Cibulskis, K.; Kernytsky, A.; Garimella, K.; Altshuler, D.; Gabriel, S.; Daly, M.; et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1297–1303. [CrossRef] [PubMed]
14. Cingolani, P.; Platts, A.; Wang Le, L.; Coon, M.; Nguyen, T.; Wang, L.; Land, S.J.; Lu, X.; Ruden, D.M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* **2012**, *6*, 80–92. [CrossRef]
15. Ye, K.; Schulz, M.H.; Long, Q.; Apweiler, R.; Ning, Z. Pindel: A pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2865–2871. [CrossRef]
16. Smit, A.; Hubley, R.; Green, P. RepeatMasker Open-4.0. 2013–2015. Available online: <http://www.repeatmasker.org> (accessed on 29 November 2022).
17. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alfoldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **2020**, *581*, 434–443. [CrossRef]
18. Karczewski, K.J.; Weisburd, B.; Thomas, B.; Solomonson, M.; Ruderfer, D.M.; Kavanagh, D.; Hamamsy, T.; Lek, M.; Samocha, K.E.; Cummings, B.B.; et al. The ExAC browser: Displaying reference data information from over 60,000 exomes. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D840–D845. [CrossRef]
19. Genomes Project, C.; Auton, A.; Brooks, L.D.; Durbin, R.M.; Garrison, E.P.; Kang, H.M.; Korbel, J.O.; Marchini, J.L.; McCarthy, S.; McVean, G.A.; et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* **2015**, *526*, 68–74.
20. Exome Variant Server. Available online: <https://evs.gs.washington.edu/EVS/> (accessed on 1 April 2022).
21. Landrum, M.J.; Lee, J.M.; Benson, M.; Brown, G.R.; Chao, C.; Chitipiralla, S.; Gu, B.; Hart, J.; Hoffman, D.; Jang, W.; et al. ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D1062–D1067. [CrossRef]
22. Varon, R.; Seemanova, E.; Chrzanowska, K.; Hnateyko, O.; Piekutowska-Abramczuk, D.; Krajewska-Walasek, M.; Sykut-Cegielska, J.; Sperling, K.; Reis, A. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur. J. Hum. Genet.* **2000**, *8*, 900–902. [CrossRef]
23. Wieme, G.; Kral, J.; Rosseel, T.; Zemankova, P.; Parton, B.; Vocka, M.; Van Heetvelde, M.; Kleiblova, P.; Blaumeiser, B.; Soukupova, J.; et al. Prevalence of Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposing Genes in Czech and Belgian Pancreatic Cancer Patients. *Cancers* **2021**, *13*, 4430. [CrossRef] [PubMed]
24. Elkholi, I.E.; Foulkes, W.D.; Rivera, B. MRN Complex and Cancer Risk: Old Bottles, New Wine. *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 5465–5471. [CrossRef] [PubMed]

25. Hu, C.; Hart, S.N.; Gnanaolivu, R.; Huang, H.; Lee, K.Y.; Na, J.; Gao, C.; Lilyquist, J.; Yadav, S.; Boddicker, N.J.; et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 440–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rybicka, M.; Woziwodzka, A.; Sznarkowska, A.; Romanowski, T.; Stalke, P.; Dreczewski, M.; Verrier, E.R.; Baumert, T.F.; Bielawski, K.P. Liver Cirrhosis in Chronic Hepatitis B Patients Is Associated with Genetic Variations in DNA Repair Pathway Genes. *Cancers* **2020**, *12*, 3295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zhen, Y.; Xiao, R.; Chen, X.; Yuan, C.; Sun, Y.; Li, J. A non-synonymous polymorphism in NBS1 is associated with progression from chronic hepatitis B virus infection to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Onco Targets Ther.* **2018**, *11*, 563–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dumon Jones, V.; Frappart, P.-O.; Tong, W.-M.; Sajithlal, G.; Hulla, W.; Schmid, G.; Herceg, Z.; Digweed, M.; Wang, Z.-Q. Nbn Heterozygosity Renders Mice Susceptible to Tumor Formation and Ionizing Radiation-Induced Tumorigenesis. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7263–7269.
29. Soukupova, J.; Zemankova, P.; Kleiblova, P.; Janatova, M.; Kleibl, Z. CZECA: CZEch CANcer paNel for Clinical Application—Design and Optimization of the Targeted Sequencing Panel for the Identification of Cancer Susceptibility in High-risk Individuals from the Czech Republic. *Klin. Onkol.* **2016**, *29* (Suppl. 1), S46–S54. [[CrossRef](#)]
30. Li, X.; Wu, Y.; Suo, P.; Liu, G.; Li, L.; Zhang, X.; Chen, S.; Xu, M.; Song, L. Identification of a novel germline frameshift mutation p.D300fs of PMS1 in a patient with hepatocellular carcinoma: A case report and literature review. *Medicine* **2020**, *99*, e19076. [[CrossRef](#)]
31. Chau, C.; van Doorn, R.; van Poppelen, N.M.; van der Stoep, N.; Mensenkamp, A.R.; Sijmons, R.H.; van Paassen, B.W.; van den Ouweland, A.M.W.; Naus, N.C.; van der Hout, A.H.; et al. Families with BAP1-Tumor Predisposition Syndrome in The Netherlands: Path to Identification and a Proposal for Genetic Screening Guidelines. *Cancers* **2019**, *11*, 1114. [[CrossRef](#)]
32. Caruso, S.; Calderaro, J.; Letouze, E.; Nault, J.C.; Couchy, G.; Boulai, A.; Luciani, A.; Zafrani, E.S.; Bioulac-Sage, P.; Seror, O.; et al. Germline and somatic DICER1 mutations in familial and sporadic liver tumors. *J. Hepatol.* **2017**, *66*, 734–742. [[CrossRef](#)]
33. Fu, J.; Wang, T.; Zhai, X.; Xiao, X. Primary hepatocellular adenoma due to biallelic HNF1A mutations and its co-occurrence with MODY 3: Case-report and review of the literature. *Endocrine* **2020**, *67*, 544–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tovar, E.A.; Graveel, C.R. MET in human cancer: Germline and somatic mutations. *Ann. Transl. Med.* **2017**, *5*, 205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Donati, B.; Pietrelli, A.; Pingitore, P.; Dongiovanni, P.; Caddeo, A.; Walker, L.; Baselli, G.; Pelusi, S.; Rosso, C.; Vanni, E.; et al. Telomerase reverse transcriptase germline mutations and hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Cancer Med.* **2017**, *6*, 1930–1940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kuhlman, J.J.; Frier, Q.J.; Sumarriva, D.; Oberley, M.; Bolton, D.; Deveras, R.A. Germline VHL Mutation Discovered in Association with EGFR-Positive Lung Cancer and Metachronous Hepatocellular Carcinoma: A Case Report. *Case Rep. Oncol.* **2021**, *14*, 1392–1398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bian, L.; Meng, Y.; Zhang, M.; Li, D. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: Implications for cancer treatment. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Abraham, J.M.; Mahan, K.; Mettler, T.; Dunitz, J.M.; Khoruts, A. Case report of synchronous post-lung transplant colon cancers in the era of colorectal cancer screening recommendations in cystic fibrosis: Screening “too early” before it’s too late. *BMC Gastroenterol.* **2019**, *19*, 137. [[CrossRef](#)]
39. Gozdowska, J.; Bieniasz, M.; Wszola, M.; Kieszek, R.; Domagała, P.; Drozdowski, J.; Tomaszek, A.; Kwiatkowski, A.; Chmura, A.; Durlik, M. Determining eligibility for and preparation to kidney transplantation of a patient with Lynch syndrome—A case report and literature review. *Ann. Transplant.* **2014**, *19*, 124–128.
40. Qudaih, A.T.; Al Ashour, B.H.; Naim, A.K.; Joudeh, A.A. Kidney Transplant Recipient With Multiple Contemporaneous Malignancies Secondary to Muir-Torre Syndrome. *Cureus* **2021**, *13*, e16642. [[CrossRef](#)]
41. Wassano, N.S.; Sergi, F.; Ferro, G.; Genzini, T.; D’Alpino Peixoto, R. Rapid Disease Progression of Liver Metastases following Resection in a Liver-Transplanted Patient with Probable Lynch Syndrome—A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep. Oncol.* **2017**, *10*, 244–251. [[CrossRef](#)]
42. Yang, R.L.; Kurian, A.W.; Winton, L.M.; Weill, D.; Patel, K.; Kingham, K.; Wapnir, I.L. Addressing inherited predisposition for breast cancer in transplant recipients. *J. Surg. Oncol.* **2016**, *113*, 605–608. [[CrossRef](#)]
43. Trepo, E.; Nahon, P.; Bontempi, G.; Valenti, L.; Falletti, E.; Nischalke, H.D.; Hamza, S.; Corradini, S.G.; Burza, M.A.; Guyot, E.; et al. Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data. *Hepatology* **2014**, *59*, 2170–2177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Singal, A.G.; Manjunath, H.; Yopp, A.C.; Beg, M.S.; Marrero, J.A.; Gopal, P.; Waljee, A.K. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **2014**, *109*, 325–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pelusi, S.; Baselli, G.; Pietrelli, A.; Dongiovanni, P.; Donati, B.; McCain, M.V.; Meroni, M.; Fracanzani, A.L.; Romagnoli, R.; Petta, S.; et al. Rare Pathogenic Variants Predispose to Hepatocellular Carcinoma in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Pirisi, M.; Toniutto, P.; Uzzau, A.; Fabris, C.; Avellini, C.; Scott, C.; Apollonio, L.; Beltrami, C.A.; Beltrami, C.; Bresadola, F. Carriage of HFE mutations and outcome of surgical resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc.* **2000**, *89*, 297–302.
47. Strnad, P.; Buch, S.; Hamesch, K.; Fischer, J.; Rosendahl, J.; Schmelz, R.; Brueckner, S.; Brosch, M.; Heimes, C.V.; Woditsch, V.; et al. Heterozygous carriage of the alpha1-antitrypsin Pi\*Z variant increases the risk to develop liver cirrhosis. *Gut* **2019**, *68*, 1099. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.