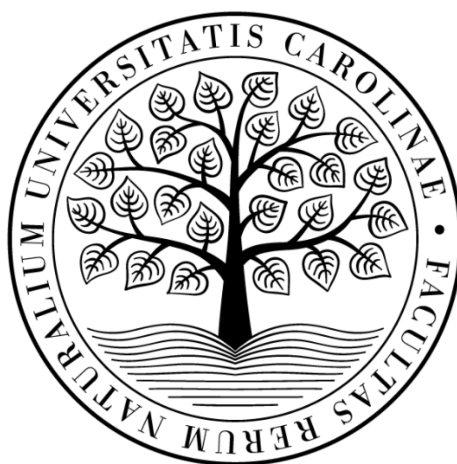


UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Doktorský studijní program: Biochemie



Mgr. Barbora Šťastná

**Detekce patogenních variant vybraných nádorových predispozičních genů a funkční
analýzy jako nástroj pro jejich klasifikaci**

Detection of pathogenic variants in selected cancer predisposition genes and functional
analysis as a tool for their classification

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Libor Macůrek, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne, 19.4.2025

Barbora Šťastná

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Zdeňku Kleiblovi, Ph.D. a konzultantovi MUDr. Liboru Macůrkovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, cenné rady a vědecké know-how, které mi po celý čas práce na disertačním projektu i mimo něj věnovali. Dále děkuji MUDr. Petře Kleiblové, Ph.D. za spolupráci a ochotu pomoci, kdykoliv to bylo potřeba. Dále děkuji všem dalším zaměstnancům a studentům Laboratoře onkogenetiky ÚLBLD 1.LF a VFN a Laboratoře biologie nádorové buňky ÚMG AV ČR za podporu, ochotnou pomoc a vytvoření přátelského prostředí, ve kterém byla radost pracovat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému manželovi a rodině za neutuchající podporu během celého postgraduálního studia.

Prohlášení o podílu na publikacích:

1. Horackova K, Frankova S, Zemankova P, Nehasil P, Cerna M, Neroldova M, **Otahalova B**, Kral J, Hovhannisyan M, Stranecky V, Zima T, Safarikova M, Kalousova M, 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*. 2023; 15(1):201. (IF₂₀₂₃=4,5)

Podíl Barbory Šťastné: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

2. Hovhannisyan M, Zemankova P, Nehasil P, Matejkova K, Borecka M, Cerna M, Dolezalova T, Dvorakova L, Foretova L, Horackova K, Jelinkova S, Just P, Kalousova M, Kral J, Machackova E, Nemcova B, Safarikova M, Springer D, **Stastna B**, Tavandzis S, Vocka M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Ernst C, Kleibl Z, Janatova M. **Population-specific validation and comparison of the performance of 77- and 313-variant polygenic risk scores for breast cancer risk prediction.** *Cancer*. 2024 May 8 (IF₂₀₂₃=6,1)

Podíl Barbory Šťastné: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, analýza kontrolního souboru, editování manuskriptu

3. Horackova K, Zemankova P, Nehasil P, Vocka M, Hovhannisyan M, Matejkova K, Janatova M, Cerna M, Kleiblova P, Jelinkova S, **Stastna B**, Just P, Dolezalova T, Nemcova B, Urbanova M, Koudova M, Hazova J, Machackova E, Foretova L, Stranecky V, Zikan M, Kleibl Z, Soukupova J. **A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer.** *Sci Rep*. 2024 Jul 13; 14(1):16183 (IF₂₀₂₃=3,8)

Podíl Barbory Šťastné: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

4. Kral J, Jelinkova S, Zemankova P, Vocka M, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Dostalek L, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Chvojka S, Kalousova M, Kosarova M, Koudova M, Krutikova 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. 25(6): 216. (IF₂₀₂₃=2,5)

Podíl Barbory Šťastné: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

5. Janatová M, Borecká M, Zemánková P, Matějková K, Nehasil P, Černá L, Černá M, Dušková P, Doležalová T, Foretová L, Havránek O, Házová J, Horáčková K, Hovhannisyan M, Hrušková L, Chvojka Š, Janíková M, Kalousová M, Kosařová M, Koudová M, Krhutová V, Krulišová V, Macháčková E, Michalovská R, Němcová B, Novotný J, Šafaříková M, **Šťastná B**, Stránecký V, Šubrt I, Tavandzis S, Vlčková Z, Vočka M, Vrtěl R, Zima T, Soukupová J, Kleiblová P, Kleibl Z. **Genetic Predisposition to Male Breast Cancer.** *Folia Biol (Praha)*. 2024; 70(5-6):274-284. (IF₂₀₂₃=1,1)

Podíl Barbory Šťastné: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

6. **Otahalova B**, Volkova Z, Soukupova J, Kleiblova P, Janatova M, Vocka M, Macurek L, Kleibl Z. **Importance of Germline and Somatic Alterations in Human MRE11, RAD50, and NBN Genes Coding for MRN Complex.** *Int J Mol Sci*. 2023; 24(6):5612. (IF₂₀₂₂=4,9)

Podíl Barbory Šťastné: literární rešerše, *in silico* modelování, příprava a finální úprava rukopisu

7. **Stastna B**, Dolezalova T, Matejkova K, Nemcova B, Zemankova P, Janatova M, Kleiblova P, Soukupova J, Kleibl Z. **Germline pathogenic variants in the MRE11, RAD50, and NBN (MRN) genes in cancer predisposition: A systematic review and meta-analysis.** *Int J Cancer*. 2024 Jun 26. (IF₂₀₂₃=5,7)
Podíl Barbory Šťastné: literární rešerše, shromáždění a příprava dat, statistická analýza a vyhodnocení, příprava a finální úprava rukopisu.

8. Kleiblova P, Cerna M, Zemankova P, Matejkova K, Nehasil P, Hojny J, Horackova K, Janatova M, Soukupova J, **Stastna B**, Kleibl Z. **Parallel DNA/RNA NGS using identical target enrichment panel in the analysis of hereditary cancer predisposition.** *Folia Biol (Praha)*. 2024; 70: 62-73. (IF₂₀₂₃=1,1)
Podíl Barbora Šťastné: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

9. Cerna M*, **Stastna B***, Pesek P, Dolezalova T, Janatova M, Soukupova J, Horackova K, Kleiblova P. **Semi-automated RNA isolation from Tempus Blood RNA tubes using the MagCore Plus II instrument.** *Folia Biol (Praha)* 2025; *accepted*. (IF₂₀₂₃=1,1)
* sdílené první autorství
Podíl Barbory Šťastné: literární rešerše, izolace RNA, statistická analýza a vyhodnocení, příprava a finální úprava rukopisu.

10. Zemankova P, Cerna M, Horackova K, Ernst C, Soukupova J, Borecka M, Blümcke B, Cerna L, Cerna M, Curtisova V, Dolezalova T, Duskova P, Dvorakova L, Foretova L, Havranek O, Hauke J, Hahnen E, Hodulova M, Hovhannisyan M, Hruskova L, Janatova M, Janikova M, Jelinkova S, Just P, Kosarova M, Koudova M, Krutilkova V, Machackova E, Matejkova K, Michalovska R, Misove A, Nehasil P, Nemcova B, Novotny J, Panczak A, Pesek P, Scheinost O, Springer D, **Stastna B**, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Tureckova E, Vesela K, Vlckova Z, Vocka M, Wappenschmidt B, Zima T, Kleibl Z, Kleiblova P. **A deep intronic recurrent CHEK2 variant c.1009-118_1009-87delinsC affects pre-mRNA splicing and contributes to hereditary breast cancer predisposition.** *Breast*. 2024 Mar 25; 75:103721. (IF₂₀₂₃=5,7)
Podíl Barbory Šťastné: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

11. Soukupova J*, **Stastna B***, Kanwal M, Hojny J, Zemankova P, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Cerna M, Curtisova V, Dolezalova T, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Hruskova L, Chvojka S, Janatova M, Janikova M, Jelinkova S, Just P, Kalousova M, Kleiblova P, Kosarova M, Koudova M, Kral J, Krausova M, Krutilkova V, Machackova E, Matejkova K, Michalovska R, Nehasil P, Nemcova B, Novotny J, Palek M, Pesek P, Safarikova M, Scheinost O, Springer D, Stolarova L, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Tureckova E, Vesela K, Vlckova Z, Vocka M, Zima T, Macurek L, Kleibl Z, CZECA-NCA consortium. **A comprehensive study evaluating germline FANCG variants in predisposition to breast and ovarian cancer.** *Cancer Med*. 2024 Aug; 13(16):e70103. (IF₂₀₂₃=2,9).
* sdílené první autorství
Podíl Barbory Šťastné: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, příprava plazmidů a stabilních linií, funkční charakterizace missense variant *in vitro*, příprava manuskriptu

12. Stolarova L, Kleiblova P, Zemankova P, **Stastna B**, Janatova M, Soukupova J, Achatz MI, Ambrosone C, Apostolou P, Arun BK, Auer P, Barnard M, Bertelsen B; Biobank Japan; Blok MJ, Boddicker N, Brunet J, Burnside ES, Calvella M, Campbell I, Chan SH, Chen F, Chiang JB, Coppa A, Cortesi L, Crujeiras-González A; Consortium CZECA-NCA; De Leeneer K, De Putter R, DePersia A, Devereux L, Domchek S, Efremidis A, Engel C, Ernst C, Evans DGR, Feliubadaló L, Fostira F, Fuentes-Ríos O, Gómez-García EB, González S, Haiman C, Hansen

TVO, Hauke J, Hodge J, Hu C, Huang H, Ishak NDB, Iwasaki Y, Konstantopoulou I, Kraft P, Lacey J, Lázaro C, Li N, Lim WK, Lindstrom S, Lori A, Martinez E, Martins A, Matsuda K, Matullo G, McInerney S, Michailidou K, Montagna M, Monteiro ANA, Mori L, Nathanson K, Neuhausen SL, Nevanlinna H, Olson JE, Palmer J, Pasini B, Patel A, Piane M, Poppe B, Radice P, Renieri A, Resta N, Richardson ME, Rosseel T, Ruddy KJ, Santamariña M, Dos Santos ES, Teras L, Toland AE, Trentham-Dietz A, Vachon CM, Volk AE, Weber-Lassalle N, Weitzel JN, Wiesmuller L, Winham S, Yadav S, Yannoukakos D, Yao S, Zampiga V, Zethoven M, Zhang ZW, Zima T, Spurdle AB, Vega A, Rossing M, Del Valle J, De Nicolo A, Hahnen E, Claes KBM, Ngeow J, Momozawa Y, James PA, Couch FJ, Macurek L, Kleibl Z. **ENIGMA CHEK2gether project: a comprehensive study identifies functionally-impaired CHEK2 germline missense variants associated with increased breast cancer risk.** *Clin Cancer Res.* 2023 Aug 15; 29(16):3037-3050. (IF₂₀₂₃ =10,0)

Podíl Barbory Šťastné: podíl na vyhodnocení výsledků funkčních analýz testovaných variant, statistická analýza, editování manuskriptu

Prohlašuji, že Mgr. Barbora Šťastná ke vzniku všech dvanácti odborných publikací, které jsou podkladem této disertační práce, přispěla podílem, který si plně zasluhuje jmenovité uvedení v autorském kolektivu. Podíly na vzniku jednotlivých článků jsou specifikovány u jednotlivých publikací.

V Praze dne, 17.4.2025

.....
prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Abstrakt

Zhoubná nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. U přibližně 5–10 % případů vznikají v důsledku zárodečné varianty způsobující dědičnou predispozici k rozvoji těchto onemocnění. Kauzální varianty se dominantně nachází v některém z dobře charakterizovaných hlavních predispozičních genů. Díky rutinně používanému sekvenování nové generace (NGS) jsou v popředí zájmu genetického testování také kandidátní predispoziční geny. Jejich proteinové produkty se účastní oprav DNA, regulují odpovědi na poškození DNA, nebo vystupují jako interakční partneři produktů známých predispozičních genů.

V rámci disertační práce byla analyzována nádorová predispozice u pacientů se zhoubnými nádory (ZN) dospělého věku, které doposud nebyly v ČR systematicky studovány (vč. mužů s karcinomem prsu, mladých žen se ZN ovarií, pacientů s hepatocelulárním karcinomem a žen se ZN endometria). V těchto kohortách jsme popsali hlavní nádorové predispoziční geny a identifikovali jsme rovněž možné kandidátní predispoziční geny a varianty. K analýzám nádorové predispozice jsme použili NGS z genomové DNA i paralelně analyzované RNA, umožňující identifikovat dopad variant na metabolismus mRNA.

V rámci kandidátních predispozičních genů jsme se zaměřili na geny MRN komplexu (*MRE11*, *RAD50*, *NBN*) a gen *FANCG*. ČR patří mezi země s nejvyšší prevalencí variant MRN genů v důsledku přítomnosti zakladatelské varianty c.657del5 v *NBN*. V meta-analýze jsme prokázali, že žádný z genů MRN komplexu neasociuje se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu, ale patogenní alterace *NBN* se podílejí na středně zvýšeném riziku k řadě dalších nádorových onemocnění (např. ZN pankreatu, prostaty nebo melanomu). Pro hodnocení kandidátního predispozičního genu *FANCG* kódujícího podjednotku Fanconi anemia komplexu jsme využili genetickou analýzu v populaci pacientek s karcinomem prsu, analýzu somatických alterací ve vzorcích ze tkáňových bločků a funkční analýzy *in vitro*. Výsledky všech analýz shodně prokázaly, že poměrně časté trunkační varianty ani vzácné missense varianty nejasného významu (VUS) *FANCG* nepřispívají ke zvýšení rizika onemocnění u jejich nosičů. Extenzivní funkční analýzu, založenou na hodnocení katalytické funkce CHK2 kinázy, jsme využili pro kategorizaci variant v *CHEK2* genu, nejčastěji postiženém středně penetrantním genu predisponujícím ke karcinomu prsu. V rozsáhlé mezinárodní studii jsme úspěšně kategorizovali 340 missense VUS *CHEK2* a ukázali jsme, že míra rizika u nosiček funkčně-defektních missense variant je obdobná jako u nosiček trunkačních variant.

Výsledky disertační práce přispívají k porozumění nádorové predispozice v české populaci a umožňují kategorizaci variant nejasného významu u vysoce rizikových pacientů, což může v důsledku vést k lepší diagnostice studovaných nádorových onemocnění.

Klíčová slova: hereditární nádorová predispozice, zárodečné varianty, panelové sekvenování, next-generation sequencing, *FANCG*, *CHEK2*, MRN komplex

Abstract

Cancer is the second most common cause of death in the Czech Republic. Approximately 5–10% of cases are caused by a germline variant causing a hereditary predisposition to develop these diseases. The causative variants are dominantly located in one of the well-characterized major predisposing genes. With routine use of next-generation sequencing (NGS), candidate predisposition genes are also at the forefront of genetic testing. Their protein products are involved in DNA repair, regulating responses to DNA damage, or act as interaction partners of the products of known predisposition genes.

In this dissertation we analyzed tumor predisposition in adult cancer patients, which have not been systematically studied in the Czech Republic (including men with breast cancer, young women with ovarian cancer, patients with hepatocellular carcinoma and women with endometrial cancer). In these cohorts, we described the main tumor predisposition genes and identified possible candidate predisposition genes and variants. We used NGS from genomic DNA and parallel RNA analyses to perform tumor predisposition analyses, allowing us to identify the impact of variants on mRNA metabolism.

Among the candidate predisposition genes, we focused on MRN complex genes (*MRE11*, *RAD50*, *NBN*) and the *FANCG* gene. The Czech Republic is one of the countries with the highest prevalence of MRN gene variants due to the presence of the founder variant c.657del5 in *NBN*. In a meta-analysis, we showed that none of the MRN complex genes are associated with an increased risk of breast cancer, but pathogenic *NBN* alterations are associated with a moderately increased risk for several other cancers (e.g. pancreatic, prostate and melanoma). To evaluate the candidate predisposition gene *FANCG* encoding a subunit of the Fanconi anemia complex, we used genetic analysis in a population of breast cancer patients, analysis of somatic alterations in tissue block samples, and in vitro functional analyses. The results of all analyses concordantly showed that relatively common truncation variants and rare missense variants of uncertain significance (VUS) of *FANCG* do not contribute to increased risk of cancer. A comprehensive functional analysis, based on the assessment of the catalytic function of CHK2 kinase, categorized variants in the *CHEK2* gene, the most frequently affected intermediate-penetrant gene predisposing to breast cancer. In a large international study, we categorized 340 missense VUS of *CHEK2* and showed that the risk in carriers of functionally defective missense variants is similar to that of truncations.

The results of the thesis contribute to the understanding of cancer predisposition in the Czech population and allow categorization of variants of unclear significance in high-risk patients, which may ultimately lead to better diagnosis of the studied cancers.

Keywords: hereditary cancer predisposition, germline variants, panel sequencing, next-generation sequencing, *FANCG*, *CHEK2*, MRN complex

Seznam zkratek

95%CI	95% konfidenční interval
ATLD	Ataxia-Telangiectasia-like Disorder
BAM	Binary Alignment Map
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR associated protein 9
CTRL	Kontrola
CZECANCA	CZEch CAncer paNel for Clinical Application
DDSB	Dvouřetězcová poškození DNA
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ENIGMA	Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles
FA	Fanconiho anemie
gnomAD	Genome Aggregation Database
GTE _x	Genotype-Tissue Expression
GPV	Zárodečné patogenní varianty
HBOC	Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií
HBOPP	Syndrom dědičného karcinomu prsu, ovaria, pankreatu a prostaty
HLA	Lidské leukocytární antigeny
HR	Homologní rekombinace
KO	Knock-out
LS	Lynchův syndrom
MAVE	Multiplexed Assays of Variant Effect
MMC	Mitomycin C
MRN	MRE11-RAD50-NBN
NBS	Nijmegen breakage syndrom
NBSLD	Nijmegen Breakage Syndrome-like Disorder
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	Sekvenování nové generace
NHEJ	Nehomologní spojování konců DNA
NMD	Nonsense mediated decay
OR	Riziko
PRS	Skóre polygenního rizika
PV	Patogenní varianty
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleová kyselina
RR	Relativní riziko
seq	Sekvenace
TPM	Traskript per milion
TSG	Tumor supresorové geny
VCF	Variant Call Format
VUS	Varianta nejasného významu
WT	Wild-type alela
ZN	Zhoubné nádory

Obsah

1. Teoretický úvod	11
1.1. Epidemiologie zhoubných nádorů (ZN).....	11
1.2. Nádorová predispozice.....	11
1.3. Predispozice ke karcinomu prsu a ovaria.....	12
1.4. Predispozice k dalším dědičným ZN dospělého věku.....	13
1.5. Hlavní nádorové predispoziční geny.....	15
1.6. Geny s nízkou penetrancí.....	16
1.7. Kandidátní nádorové predispoziční geny.....	17
1.7.1. Geny kódující MRN komplex	17
1.7.2. FANCG	19
1.8. Hodnocení patogenity germinálních variant	20
2. Cíle práce.....	22
3. Metody	23
3.1. Pacienti, kontroly a vzorky genetického materiálu	23
3.2. Cílené sekvenování nové generace DNA a RNA.....	23
3.3. Bioinformatické analýzy	24
3.4. Funkční analýzy	24
3.5. Statistické analýzy.....	25
4. Výsledky a diskuze.....	27
4.1. Vyšetření nádorové predispozice u vysoce rizikových pacientů.....	27
4.1.1. Analýza nádorové predispozice u pacientů s hepatocelulárním karcinomem	27
4.1.2. Analýza PRS u pacientek s nádory prsu.....	30
4.1.3. Analýza nádorové predispozice u mladých pacientek se ZN ovaria	32
4.1.4. Analýza nádorové predispozice u pacientek s nádory endometria.....	35
4.1.5. Analýza nádorové predispozice u mužů s karcinomem prsu	37
4.1.6. Význam MRN komplexu a analýzy jeho genů (review)	39
4.1.7. Meta-analýza nádorové predispozice u nosičů patogenních variant v genech MRN komplexu.....	42
4.2. Optimalizace analýz RNA pro účely diagnostiky nádorové predispozice	47
4.2.1. Paralelní analýza DNA/RNA jako nástroj pro klasifikaci patogenních variant ..	47
4.2.2. Automatizace izolace RNA	50
4.2.3. Využití sekvenování RNA pro charakterizaci rekurentní zakladatelské patogenní varianty v genu <i>CHEK2</i>	52
4.3. Klasifikace variant pomocí funkčních analýz <i>in vitro</i>	54
4.3.1. Funkční analýza variant nejasného významu genu <i>FANCG</i> nalezených u pacientek s karcinomem prsu a ovarii	54
4.3.2. Funkční analýza zárodečných missense variant <i>CHEK2</i> asociovaných se zvýšeným rizikem karcinomu prsu.....	58
5. Závěr	61
6. Seznam publikací týkající se této disertační práce	64
7. Seznam literatury.....	66
8. Přílohy (práce <i>in extenso</i>).....	75

1. Teoretický úvod

1.1. Epidemiologie zhoubných nádorů (ZN)

Zhoubná nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních chorobách druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Podle posledních reportovaných dat z roku 2021 vedly ZN k úmrtí 18 % mužů a 17 % žen [1]. V roce 2020 bylo do Národního onkologického registru nově nahlášeno 84 591 případů ZN. Nejčastěji se vyskytujícími jsou nemelanomové ZN kůže (23 % případů), onemocnění s nízkou malignitou. Nejčastějšími závažnými nádorovými novotvary jsou ZN prostaty (24,9 % ZN u mužů) a ZN prsu (27,2 % ZN u žen). U obou pohlaví následují zhoubné nádory tlustého střeva a konečníku a zhoubné nádory průdušnice, průdušek a plic. Tato nejčastější nádorová onemocnění tvoří dohromady téměř polovinu (48,5 %) všech ZN diagnostikovaných v ČR v roce 2021 [2].

1.2. Nádorová predispozice

Zhoubné nádory řadíme mezi genetické multifaktoriální onemocnění charakteristické nekontrolovaným růstem maligně transformovaných buněk napříč výstavbovým plánem organismu s potenciálem zakládat vzdálené metastázy. Maligní transformace buněk vzniká v důsledku akumulace genetických a epigenetických změn, které zasahují do hlavních buněčných procesů řídících homeostázu buněk ve tkáních [3-5].

K maligní transformaci buňky dochází nejčastěji poškozením dvou skupin genů, které kódují proteiny ovlivňující růst, přežívání, zánik či migraci nádorových buněk – protoonkogeny a tumor supresorové geny (TSG). Protoonkogeny kódují promitotické a anti-apoptotické proteiny, které pozitivně ovlivňují mitogenezi, migraci a přežívání buněk. Pro aktivaci protoonkogenů na onkogeny postačuje aktivační mutace (*gain-of-function*) jedné alely, proto označujeme protoonkogeny jako dominantní geny. Protipólem jsou TSG, které působí anti-mitoticky a proapoptoticky. Mutace tumor supresorových genů jsou naopak inaktivující (*loss-of-function*) vedoucí k ztrátě funkčního proteinu na obou alelách (podle Knudsonovy teorie dvojího zásahu), a proto tyto geny označujeme jako recesivní [6, 7]. Mezi tumor supresorové geny řadíme i všechny geny kódující DNA reparační proteiny.

Většina nádorových onemocnění (90–95 %) jsou tzv. nádorová onemocnění sporadická, která vznikají na základě akumulace somatických mutací v genomové DNA postižené tkáni v průběhu života. Menší zastoupení nádorových onemocnění (5–10 %) představují hereditární nádorová onemocnění, která vznikají v důsledku přítomnosti zárodečné patogenní varianty (GPV) v některém z nádorových predispozičních genů [8]. Patogenní varianty predisponující ke vzniku hereditárního nádorového onemocnění jsou až na vzácné výjimky pozorovány v TSG.

Charakteristickými znaky hereditárních nádorových onemocnění je časný nástup nemoci (často o dekády dříve, než je tomu u sporadických forem), vícečetný výskyt zhoubných nádorů během života a vysoká kumulace nádorových onemocnění v rodině [6, 9]. Ačkoliv tvoří hereditární nádorová onemocnění menší skupinu onkologických pacientů, jedná se o skupinu významnou, u níž je identifikace příčinné genetické varianty nezbytná pro prediktivní testování a časný záchyt onemocnění u vysoce rizikových osob [10].

1.3. Predispozice ke karcinomu prsu a ovaria

Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním žen v České republice a v roce 2021 se jednalo o 27,2 % nově diagnostikovaných ZN u žen. Incidence tohoto zhoubného onemocnění v ČR dlouhodobě meziročně stoupá (139,6 na 100 000 žen) avšak trend mortality ZN prsu u žen vykazuje v posledních letech lehký pokles (33,5 úmrtí na 100 000 žen). Přesto se jedná o 2. nejčastější příčinu úmrtí v rámci onkologických diagnóz u žen (**Obrázek 1**) [2].

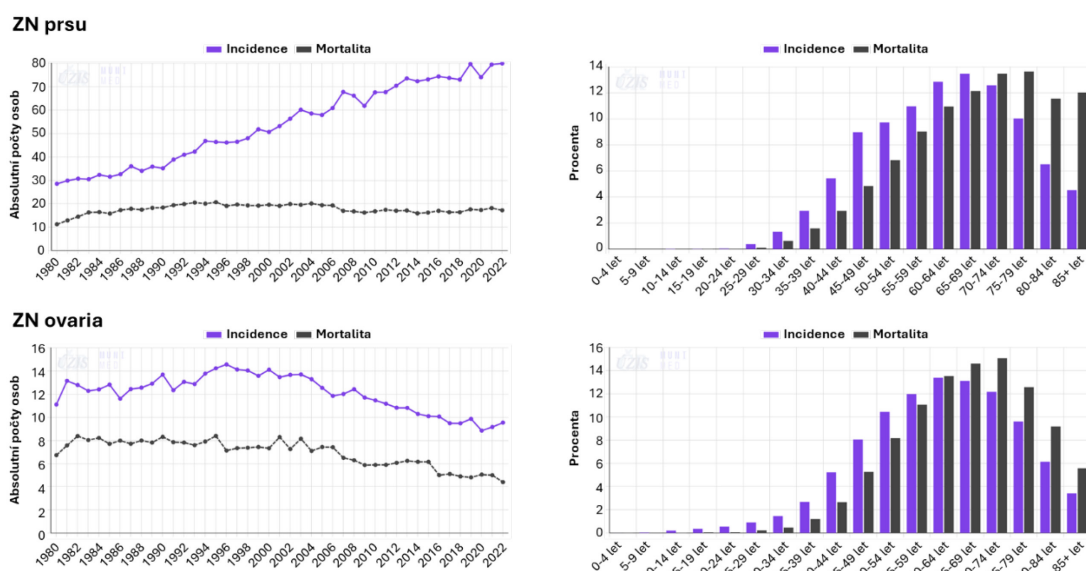
Nejvíce případů karcinomu prsu jsou sporadického původu, nicméně u 5–10 % patientek je diagnostikována příčinná mutace, která u patientek způsobuje dědičnou formu onemocnění [11]. Hlavními predispozičními geny, jejichž germinální varianty významně zvyšují pravděpodobnost vzniku karcinomu prsu, jsou geny *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *PTEN* a *CDH1* [12]. Příčinné patogenní varianty v genech *BRCA1* a *BRCA2* se vyskytují nejčastěji. Méně časté jsou varianty v genech se střední penetrancí (např. *CHEK2* a *ATM*), přičemž četnost záchytu variant v genu *CHEK2* je v naší populaci třetí nejvyšší po *BRCA2* a *BRCA1* [13]. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu dosahuje v běžné populaci zhruba 8–10 %, zatímco u nosiček patogenních variant v *BRCA1* a *BRCA2* až 80 % [12, 14]. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací v genech *CHEK2* a *ATM* se blíží trojnásobku populačního rizika [15, 16]. Rizika u nosiček patogenních variant v *TP53*, *PTEN* a *CDH1* jsou vysoká, avšak jejich prevalence je řádově méně častá (100×), než prevalence nosiček patogenních mutací v hlavních predispozičních genech.

Nádory prsu se dominantně nachází u žen, avšak vzácně se vyskytují i u mužů, kde představují méně než 1 % diagnostikovaných nádorových onemocnění, nicméně incidence se meziročně celosvětově zvyšuje. V roce 2022 bylo v České republice diagnostikováno tímto onemocněním 75 mužů [2]. U 15 % diagnostikovaných případů ZN prsu u mužů je nalezena dědičná predispozice [17]. U mužů dominují zárodečné varianty v genu *BRCA2* a vůči běžné populaci u mužů zvyšují riziko vzniku ZN prsu až 80× [17, 18].

Zhoubné nádory ovaria patří mezi jedny z nejzávažnějších ženských malignit. Ačkoliv jejich incidence (17,4 na 100 000 žen) i mortalita (11,6 na 100 000 žen) meziročně klesá (**Obrázek 1**), každý rok je tímto ZN diagnostikováno zhruba 1000 žen (982 v roce 2022), což řadí Českou republiku mezi země s nejvyšším výskytem na světě [2]. Zhoubné nádory ovaria jsou významně heterogenní onemocnění se širokým spektrem různých histologických typů. Mezi nimi

jsou nejčastější *high-grade* serózní karcinomy, u kterých se setkáváme s významnou dědičnou komponentou. V naší populaci nacházíme zárodečnou variantu v některém ze známých tumor supresorových genů u více než 25 % pacientek, přičemž nejčastěji jsou pozorované patogenní varianty v genech *BRCA1* a *BRCA2* [19]. Celoživotní riziko vzniku ZN ovaria se v obecné populaci pohybuje okolo 1,5 %, u nosiček patogenních variant v predispozičních genech je výrazně vyšší (až 20 % u nosiček mutací *BRCA1*) a úzce souvisí s rodinnou anamnézou.

Mezi geny, jejichž nosičství zárodečných patogenních variant prokazatelně asociuje se ZN prsu a/nebo ovaria, se dle aktuálních doporučení NCCN řadí geny *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2/EPCAM*, *MSH6*, *NF1*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* a *TP53*. Mezi další diskutované geny jejichž GPV zvyšují riziko vzniku ZN prsu a/nebo ovaria se řadí *FANCC*, *MRE11*, *NBN*, *RECQL4*, *RINT*, *SLX4*, *SMARCA4* a *XRCC2* [20].



Obrázek 1: Časový vývoj incidence a mortality ZN prsu a ZN ovaria v ČR (absolutní počty na 100 000 obyvatel, přepočet na světový standard) a věková struktura populace pacientek ČR v době diagnózy SVOD, <http://www.svod.cz>

1.4. Predispozice k dalším dědičným ZN dospělého věku

Zhoubný nádor slinivky břišní je součástí tzv. syndromu dědičného karcinomu prsu, ovaria, pankreatu a prostaty (HBOPP), který se u postižených rodin vyznačuje zvýšeným výskytem zmiňovaných nádorů [19, 20]. Zhoubný nádor slinivky je celosvětově 6. nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění a v České republice byl v rámci onkologických diagnóz 3. nejčastější příčinou úmrtí v roce 2021 [2]. V roce 2021 byla incidence 22,8 na 100 000 osob téměř shodná jako mortalita 22,3 úmrtí na 100 000 osob, přičemž meziročně oba parametry narůstají. Až 80 %

ZN slinivky tvoří agresivní duktální adenokarcinom, u kterého je přibližně 10 % případů hereditárního původu [21]. Nejčastěji alterované predispoziční geny zvyšující riziko onemocnění jsou dle NCCN doporučení *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2/EPCAM*, *MSH6*, *PALB2*, *STK11* a *TP53* [20]. V České republice jsou nejčastěji alterované geny *BRCA2* a *BRCA1* u nichž je riziko vzniku ZN slinivky výrazně zvýšeno (*BRCA2* OR=6,4 a *BRCA1* OR=10,4) [22].

Karcinom prostaty je nejčastějším diagnostikovaným onkologickým onemocněním u mužů. Jeho incidence meziročně dlouhodobě narůstá (149,8 na 100 000 mužů) zatímco mortalita je i přes rostoucí incidenci dlouhodobě stabilní (27,6 na 100 000 mužů). Přesto byl ZN prostaty v roce 2021 u mužů v České republice 3. nejčastější příčinou úmrtí na onkologickou diagnózu [2]. Přibližně 8 % diagnostikovaných onemocnění je dědičného původu. Nejčastěji alterované geny zvyšující riziko vzniku ZN prostaty jsou geny *ATM*, *BRCA1* (pod hranicí klinicky významného rizika; OR~1,3), *BRCA2*, *CHEK2*, *HOXB13* a *TP53* [20, 23].

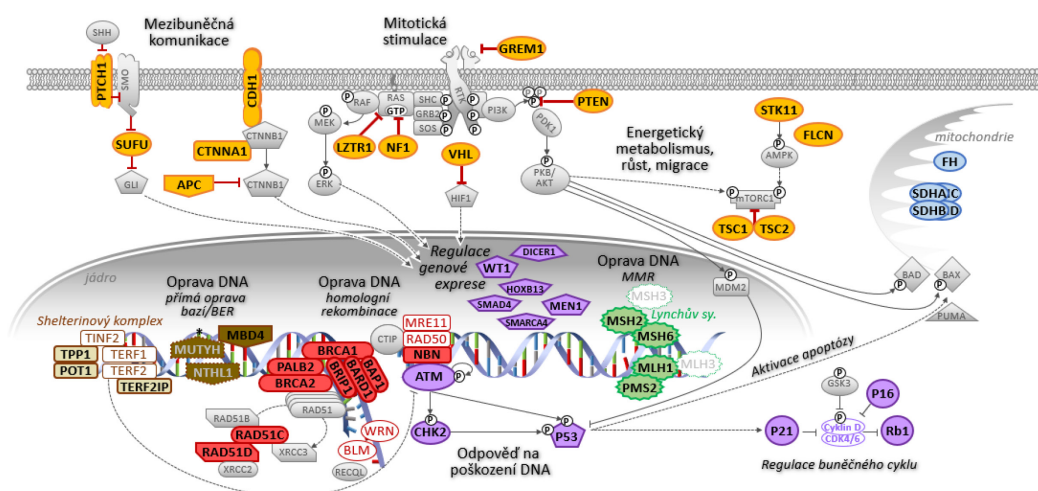
Celosvětově nejčastějším gynekologickým onkologickým onemocněním je **ZN endometria** [24]. V České republice to byl v roce 2021 4. nejčastěji diagnostikovaný novotvar, přičemž v posledních letech je pozorován pokles incidence (34,6 na 100 000 žen) a stabilizace mortality (7,9 na 100 000 žen) [2]. ZN endometria jsou nejčastěji sporadického původu a pouze 3-5 % je hereditárního původu [25]. Dosud je hereditární forma ZN endometria spojována především s dědičnými alteracemi v genech Lynchova syndromu (LS), který způsobuje hereditární nepolypózní formu karcinomu tlustého střeva a ZN endometria je jeho druhým nejčastějším projevem [24]. Vznik Lynchova syndromu je podmíněn geminálními variantami v genech zajišťující opravy chybného párování bazí v DNA („*mismatch repair*“) a mezi nejčastěji alterované geny patří *MLH1*, *MSH2/EPCAM*, *MSH6*, *PMS2* a mezi kandidátní geny ZN endometria se řadí *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*, *AKT1*, *APC*, *ATM*, *BRIPI*, *FAN1*, *FANCC*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *SDHB*, *SDHC* a *SDHD* [26]. V České republice je u pacientek s ZN endometria nejčastěji alterovaný gen *MSH6* a *BRCA1* [27].

Zhoubné nádory jater a intrahepatálních žlučových cest jsou celosvětově 4. nejčastěji diagnostikovaným ZN, avšak v České republice se jedná o onemocnění významně méně časté, i když jeho incidence i mortalita dlouhodobě mírně narůstá. V roce 2021 bylo toto onemocnění 15. nejčastěji diagnostikovaným ZN (9,4 na 100 000 osob) a incidenci téměř odpovídala i mortalita (8,4 na 100 000 osob) a toto onemocnění bylo 9. nejčastější příčinou úmrtí v rámci onkologických diagnóz. U mužů se hepatocelulární karcinom vyskytuje 2-2,5× častěji než u žen, což patrně souvisí s environmentálními a behaviorálními rizikovými faktory pro toto onemocnění (alkoholismus, progredující hepatitida, cirhóza) [2, 28]. Dědičná predispozice byla považována za velmi raritní, avšak dvě práce v roce 2022 překvapivě popsaly přibližně 12 % pacientů se ZN

jater, kteří byli nosiči variant ve vysoce penetrantních genech spojených se syndromem dědičného karcinomu prsu a/nebo ovaria (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*) nebo Lynchova syndromu (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) [29, 30].

1.5. Hlavní nádorové predispoziční geny

Nádorových predispozičních genů bylo doposud popsáno několik set, desítky z nich jsou predispoziční geny s jasným klinickým významem [8]. Za takovéto geny považujeme ty, jejichž GPV prokazatelně a klinicky významně (relativní riziko > 2 proti běžné populaci) zvyšují riziko vzniku konkrétního onemocnění. Pro nosiče patogenních variant v klinicky významných genech jsou připravována klinická doporučení stanovující opatření primární a sekundární prevence vzniku ZN. Nejčastěji mutovanými predispozičními geny jasného klinického významu jsou v naší populaci geny *BRCA1* a *BRCA2*, jejichž genové produkty se účastní opravy dvouřetězcových poškození DNA procesem homologní rekombinace. V predispozici k nádorovým onemocněním sehrávají úlohu i poruchy v dalších genech kódujících proteiny různých signálních kaskád v buňce (**Obrázek 2**).



Obrázek 2: Přehled klinicky významných proteinů (barevné tvary) kódovaných nádorovými predispozičními geny. Převzato z Janatova *et al.* Diagnostika dědičných nádorových onemocnění v Zima T *et al.* Klinická biochemie. Praha 2025. *In press.*

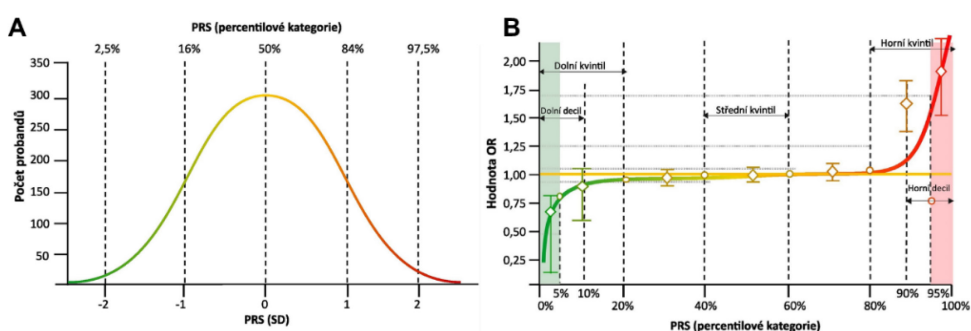
Varianty, které jsou identifikovány v rámci genetického testování, jsou hodnoceny z mnoha hledisek (typ a charakter varianty, frekvence v populačních databázích, asociace s onemocněními, funkční klasifikace a *in silico* predikce biologického významu) a výsledně tříděny na základě 5-třídního systému dle ACMG/AMP [31]. Zásadním referenčním zdrojem pro hodnocení germinálních variant je databáze ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Třídy (class) 1-2 označují varianty klinicky benigní/pravděpodobně benigní (bez souvislosti se vznikem nádorového onemocnění), třídy 4-5 označují varianty patogenní/pravděpodobně patogenní (způsobující predispozici k ZN). Přes mnohé klasifikované varianty je stále velké množství variant nejasného významu („*Variant of Uncertain Significance*“, VUS, class 3), u kterých je pro

jejich klinickou klasifikaci nutné, aby asociace těchto kandidátních variant byla ověřena ve velkých studiích doplněných o funkční analýzy. Identifikace VUS komplikuje klinickou interpretaci genetických analýz u vysoce rizikových osob, a proto je re-klasifikace VUS na varianty benigní nebo patogenní významným úkolem preklinického výzkumu [32, 33].

Pravděpodobnost, že se u nosičů určité patogenní varianty v nádorovém predispozičním genu vyvine nádorové onemocnění označujeme jako **penetranci**. V naprosté většině není penetrance hereditárních nádorových onemocnění úplná. Podle míry relativního rizika (RR) vzniku u častých nádorových onemocnění můžeme predispoziční geny na geny s vysokou penetrancí ($RR > 4$), geny se střední penetrancí ($RR = 2-4$) a geny s nízkou penetrancí ($RR < 2$) [12]. Patogenní varianty v klinicky významných genech se střední nebo vysokou penetrancí se tak v běžné populaci vyskytují velmi vzácně s frekvencí nižší než 1:10 000. Výjimku tvoří vrozené populačně specifické zakladatelské varianty („*founder*“), jejichž zvýšená prevalence je typická pro určité geograficky nebo etnicky definované populace [34].

1.6. Geny s nízkou penetrancí

V populaci jsou nejčastěji zastoupeny varianty v genech s nízkou penetrancí ($>5\%$), které nejsou samy o sobě klinicky významné. Každý jedinec je tak nosičem řady nízkopenetrantních variant, jejichž účinky se sčítají. Při nakupení rizikových variant může jejich aditivní účinek dosáhnout rizika srovnatelného s riziky patogenních variant ve středně penetrantních genech. Hodnota agregovaného rizika v nízkopenetrantních alelách (jejichž frekvence se u onkologických pacientů a zdravých kontrol v rozsáhlých GWAS studiích signifikantně liší) se používá jako tzv. skóre polygenního rizika (**polygenic risk score, PRS**). Set variant je kalibrován pro konkrétní populaci tak, aby průměrné PRS skóre odpovídalo průměrnému riziku, u kterého se OR (*odds ratio*) rovná 1 (**Obrázek 3**).



Obrázek 3: (A) Hypotetická distribuční křivka PRS rozděleného do percentilů a jednotek jim odpovídajících standardních odchylek (SD). Většina probandek spadá do rozpětí 1 SD, kterému odpovídá průměrné populační riziko. (B) Křivka hypotetického rozložení hodnot PRS v populaci žen s ca prsu. Všechny probandky jsou seřazeny podle stoupající hodnoty PRS a kategorizovány do skupin (kvantilových či decilových). Kosočtverce s anténami označují hodnoty OR v jednotlivých kvintilech (a horním a dolním 5% resp. 95% percentilu) s 95% konfidenčním intervalem. Uvedené hodnoty jsou pouze ilustrativní. Převzato z Hovhannysian *et al.* 2023 [35].

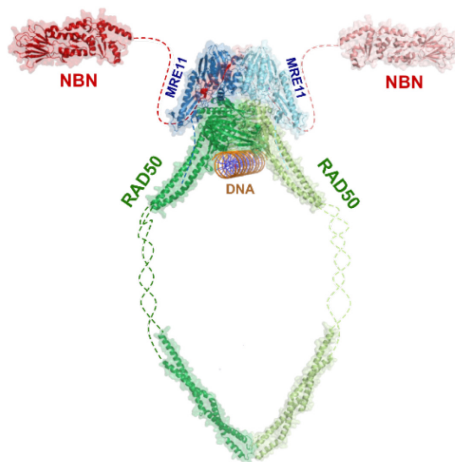
1.7. Kandidátní nádorové predispoziční geny

Kromě známých predispozičních genů jsou v popředí zájmu genetického testování také kandidátní predispoziční geny, jejichž proteinové produkty se účastní oprav DNA nebo regulují odpovědi na poškození DNA. Tyto geny jsou kandidáty pro zařazení především mezi středně penetrantní predispoziční geny a jejich asociace s nádorovým onemocněním je analyzována na základě velkých populačních studií, meta-analýz nebo funkčních studií [12]. Rozmach uvedených studií je důsledkem masivního zavedení sekvenování nové generace (NGS) do diagnostiky nádorové predispozice v posledních letech. NGS umožňuje analýzy rozsáhlých genových oblastí na ohromných souborech pacientů a kontrol.

1.7.1. Geny kódující MRN komplex

Mezi dlouho zvažované kandidátní nádorové predispoziční geny patří geny *MRE11*, *RAD50* a *NBN*. Kódují proteiny heterotrimerního jaderného komplexu MRN, který rozpoznává a zajišťuje opravu dvouřetězcových poškození DNA („DNA double strand breaks“, DDSB) [36]. MRN komplex působí díky těmto třem biochemicky odlišným proteinům jako prvotní senzor DDSB, ale má také dominantní úlohu v rozhodování, který typ opravy dvouřetězcových zlomů bude zvolen [37].

Nukleáza MRE11 tvoří strukturní jádro MRN komplexu tím, že váže a propojuje další dva proteiny RAD50 a NBN. MRE11 je enzym s exonukleázovou i endonukleázovou funkcí a podílí se na enzymatické úpravě DNA v místě poškození. Nukleázová aktivita MRE11 je regulována aktivitou **ATPázy RAD50**, největšího proteinu MRN komplexu, který rozpoznává místa DDSB poškození. Amplifikaci a přenos signálu zajišťuje **protein NBN**, který také reguluje enzymatickou aktivitu MRE11 (**Obrázek 4**) [36, 38-40].



Obrázek 4: Schematická struktura MRN komplexu vytvořena v programu PyMol (<https://pymol.org/>; verze 2.5.2). Jednotlivé komponenty NBN (Protein Data Bank (PDB) ID: 3HUE), MRE11 (PDB ID: 4FBW) a RAD50 (PDB ID: 5DAC). Převzato z [36].

Patrně nejvýznamnější **aktivitou MRN komplexu** je aktivace kinázy ATM prostřednictvím NBN [41]. Aktivovaná kináza ATM je následně schopná fosforylovat proteiny zapojené do oprav DNA poškození a aktivovat regulační systémy buněčného cyklu (včetně p53 a CHK2), které jsou důležité pro aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu (tzv. checkpointů) (**Obrázek 2**). V rámci oprav DNA poškození má MRN komplex dominantní postavení v rozhodnutí, zda budou DDSB opraveny cestou homologní rekombinace (HR) nebo nehomologním spojováním konců (NHEJ). Aktivovaná ATM kináza spouští signální kaskádu a aktivovaný MRN komplex (prostřednictvím kofaktoru CtIP) katalyzuje řízenou resekci poškozených 3'-konců DNA, které jsou nezbytné pro opravu prostřednictvím HR v průběhu S a G2 fáze buněčného cyklu [42]. Mimo S a G2 fázi buněčného cyklu není dostupná sesterská chromatida, která by umožnila opravu DDSB prostřednictvím homologní rekombinace a oprava probíhá dominantně pomocí NHEJ. Důležitou úlohou MRN komplexu v rámci HR je stabilizace a provázání přerušených konců DNA [43]. Třetí prokázanou funkcí MRN komplexu je zapojení do replikace DNA v procesu remodelace zastavených replikačních vidliček [44]. V případě zastavené nebo zpomalené replikace v důsledku DNA poškození dochází k navázání MRN komplexu do místa zastavené vidličky, kde MRN komplex prostřednictvím nukleázové aktivity MRE11 remodeluje poškozené DNA konce replikační vidličky [45, 46].

Bialelické inaktivace *MRE11*, *RAD50* a *NBN* jsou příčinou vzácných autozomálně recesivních syndromů spojených s chromozomální nestabilitou a částečně se překrývajících charakteristikami, u kterých dominují neurologické potíže a náchylnost k maligním onemocněním [36].

Nejčastějším syndromem je **Nijmegen breakage syndrom** (NBS, známý také jako syndrom Seemanové, OMIM: #251260) způsobený bialelickou inaktivací *NBN* [47]. 90 % NBS pacientů je slovanského původu a typicky se jedná o homozygoty slovanské zakladatelské varianty c.657_661delACAAA (c.657del15), která je hypomorfni variantou zachovávající částečnou funkci NBN. Vysoká frekvence heterozygotních nosičů této varianty byla pozorována v populacích Slovenska, České republiky, Polska, Ukrajiny a Bulharska [48]. Mezi typické příznaky NBS patří mentální a růstová retardace, kongenitální mikrocefalie, chromosomová nestabilita, imunodeficience, radiosenzitivita a zvýšené riziko lymfoidních nádorů (nejčastěji non-Hodgkinův lymfom) [49]. V současnosti neexistuje pro pacienty s NBS žádná specifická léčba a klasická radioterapie musí být vzhledem k extrémní radiosenzitivitě vyloučena [50].

Bialelická inaktivace *MRE11* způsobuje onemocnění **Ataxia-Telangiectasia-like Disorder** (ATLD, OMIM: #613078), které je extrémně vzácné a do roku 2020 bylo popsáno pouze u 23 jedinců [51]. Klinické příznaky se překrývají s ataxií-telangiektázií (bialelickou poruchou genu *ATM*) a NBS syndromem, nicméně rozvoj malignit u pacientů s ATLD není příliš častý.

Ještě méně častým je **Nijmegen Breakage Syndrome-like Disorder** (NBSLD, OMIM: #613078) vznikající v důsledku bíalelické inaktivace *RAD50*. Dosud bylo toto onemocnění diagnostikováno u tří osob [52, 53]. Klinické příznaky se překrývají s ATLD a NBS a charakteristický je častý výskyt malignit, radiosenzitivita a neurodegenerace.

Heterozygotní nosiči zárodečných variant v genech MRN komplexu jsou často spojováni se zvýšeným rizikem vzniku ZN napříč různými diagnózami [36].

Nejvíce studií genu *NBN* bylo provedeno v populacích slovanského původu, což je způsobeno vysokou frekvencí výskytu zakladatelské mutace c.657del5. Nejčastěji studovaná asociace variant v genu *NBN* je se zhoubným nádorem prsu, nicméně tato asociace nikdy nebyla potvrzena ani velkými studiemi a je tedy možné usuzovat, že nosičství zárodečných variant v genu *NBN* nesouvisí se zvýšeným rizikem vzniku ZN prsu [15, 16]. Některé studie však potvrzují zvýšené riziko vzniku lymfomů [54], melanomu [54, 55], ZN ovaria [19, 56], ZN slinivky [57, 58], ZN prostaty [59, 60], ZN děložního čípku [54] a hematologických malignit [61].

V případě heterozygotních variant v *RAD50* a *MRE11* zůstává klinický význam a riziko zvýšeného výskytu onkologických onemocnění stále nejasné, především v důsledku nízké frekvence jejich výskytu (kolem 0,1 – 0,2 % onkologických pacientů) [36]. Zárodečné varianty genu *RAD50* jsou spojovány se zvýšeným rizikem vzniku ZN kolorekta [62] a ZN slinivky [63]. Ve finské populaci se vyskytuje častá rekurentní zakladatelská varianta c.658delT, která významně zvyšuje riziko vzniku ZN prsu ve finské populaci, nicméně spojitost variant v *RAD50* s ZN prsu nebyla v jiných studiích a populacích potvrzena [15, 16]. Varianty v *MRE11* jsou velmi vzácné a nalezeny byly u pacientů s mezoteliomem [64] a rakovinou prsu [65, 66].

1.7.2. FANCG

Gen *FANCG/XRCC9* kóduje protein, který je součástí skupiny genů Fanconiho anemie (FA), které dohromady tvoří multiproteinový komplex (FA komplex) zahrnující více než dvě desítky proteinů účastnících se opravy mezireťezcových spojení a DDSB pomocí homologní rekombinace [67]. Primární rolí FA komplexu je monoubikvitinylace proteinu FANCD2, který tvoří dimer s FANCI aktivující další proteiny zapojené do DNA reparace. Mezi geny FA patří řada důležitých nádorových predispozičních genů s jasným klinickým významem, včetně *BRCA1* (*FANCS*) a *BRCA2* (*FANCD1*), ale také *PALB2* (*FANCN*) a *RAD51C* (*FANCO*) [68].

Bíalelické inaktivace *FANCG* jsou příčinou vzniku FA komplementární skupiny G (OMIM: #614082) a spolu s bíalelickými inaktivacemi *FANCA* a *FANCC* patří mezi tři nejčastěji porušené geny u pacientů s FA. Toto vzácné genetické onemocnění se vyznačuje poruchami krvevotvorby, vznikem vývojových abnormalit a vysokou nádorovou predispozicí. Heterozygotní zárodečné

varianty v genu *FANCG* byly nalezeny u pacientů s ZN prsu [69], ZN ovaria [19, 70] a ZN slinivky [71, 72], avšak význam těchto spíše ojedinělých nálezů byl nejasný.

1.8. Hodnocení patogenity germinálních variant

S rozvojem sekvenování nové generace výrazně vzrostl počet identifikovaných variant v analyzovaných genech, přičemž většina z nalezených variant má nejednoznačný nebo nejasný klinický význam. Z tohoto důvodu je zcela nezbytné mít efektivní nástroje umožňující systematickou interpretaci a predikci patogenity nalezených variant.

V rámci predikce patogenity genetických variant hraje klíčovou roli jejich rozdělení do tříd (*class*) 1 – 5 podle **kritérií ACMG/AMP**, jak jsme uvedli v kapitole 1.5 [31]. Tento systém umožňuje interpretaci a klasifikaci variant podle jejich klinického kontextu. Kritéria pro klasifikaci patogenních variant (*class* 4-5) se následně dělí do čtyř skupin – velmi silné důkazy patogenity (PVS1), silné důkazy patogenity (PS1 – PS4), středně silné důkazy patogenity (PM1 – PM6) a podpůrné důkazy patogenity (PP1 – PP5). Predikce patogenity by měla vycházet z více typů analýz, které společně přispívají k interpretaci klinického dopadu daných variant. Podobný systém má i klasifikace benigních variant (*class* 1-2).

Důležitou roli hrají průkazy o asociaci dané varianty s jejím fenotypem na základě dat z klinických studií nebo specializovaných **databází** (ClinVar, LOVD, HGMD) a rozsáhlých multipopulačních databází (gnomAD) [73, 74]. Zásadní význam pro hodnocení patogenity populačně-specifických variant mají populační databáze (v ČR ACGT, CZEKANCA). Informace z těchto databází mohou sloužit jako podpůrný důkaz, že daná varianta má kauzální vztah k danému onemocnění, zejména pokud je varianta výrazně zastoupena v souboru pacientů a zároveň má velmi nízkou nebo nulovou populační frekvenci. Populační databáze jsou rovněž důležitým zdrojem pro odhad rizik spojených s nosičstvím patogenních variant ve vybraném genu hodnocených na základě *case-control* analýz.

Dalším průkazem patogenity jsou genetické **segregační analýzy** zaměřující se na dědičnost varianty v postižených rodinách [75]. Pokud varianta segreguje s daným onemocněním a chybí u zdravých členů rodiny, pak segregační analýza poskytuje další důkaz o možné kauzalitě dané varianty. Výpovědní hodnota segregačních analýz je však v případě málo početných rodin a středně penetrantních genů velmi omezená.

Při predikci patogenity daných variant je také důležité, zohlednit jejich **vliv na sestřih** a metabolismus pre-mRNA. Proces sestřihu je vysoce regulovaný a jeho narušení může vést k produkci aberantních transkriptů a následně vzniku nefunkčních proteinů. Predikce vlivu variant na sestřih pre-mRNA vychází z *in-silico* predikčních nástrojů i z experimentálních dat. Mezi používané bioinformatické prediktory, které modelují pravděpodobnost vzniku alternativních sestřihových událostí nebo vliv variant na sílu kanonických sestřihových míst jsou

SpliceAI, SPiP, MaxEntScan, dbSNV a Human Splicing Finder [76-80]. Ačkoliv mohou konzistentní *in silico* predikce podpořit vysvětlení patogenity dané sestřihové varianty, nejvýznamnějším nástrojem je funkční analýza sestřihových změn pomocí RNA sekvenování, které identifikuje různé alternativní a aberantní sestřihové události [81].

Vedle asociačních a segregčních analýz a *in silico* predikcí jsou pro predikci patogenity jednotlivých variant důležité také **funkční analýzy** testující vliv jednotlivých variant na buněčné procesy [82, 83]. Tyto analýzy mohou být prováděny *in vitro* v buněčných liniích, *ex vivo* v primárních buňkách pacientů nebo *in vivo* na zvířecích modelech. Cílem funkčních analýz je zjistit, zda má daná varianta prokazatelný vliv na funkci studovaného proteinu a buněčný fenotyp, například snížením stability proteinu, ztrátou specifických interakcí, poruchou buněčné proliferace, narušením funkce specifických signálních drah nebo změnou kinetiky oprav po DNA poškození.

S přibývajícím množstvím identifikovaných variant nejasného významu vznikla potřeba paralelního testování stovek až tisíců variant. Toto paralelní funkční testování velkého množství variant umožňuje technologie **MAVE** („*Multiplexed Assays of Variant Effect*“), která umožňuje paralelní testování rozsáhlých knihoven variant v cílové oblasti genu [84]. Knihovny variant jsou vytvořeny pomocí cílené mutagenese nebo CRISPR-Cas9 editace a následně jsou zavedeny do vhodného modelového systému (kvasinky, buněčné linie), na který se působí selekčním tlakem, jež odliší funkční a nefunkční varianty. Po hromadné selekci je analyzováno a kvantifikováno zastoupení jednotlivých variant před a po působení selekčního tlaku pomocí NGS. Na základě změn v relativní četnosti je každé variantě přiřazeno funkční skóre, které odráží její aktivitu vůči referenční *wild-type* (WT) sekvenci. Výsledkem je tzv. funkční mapa variant, díky které je možné jasně rozlišit patogenní a benigní varianty, ale také identifikovat varianty s hypomorfním efektem.

MAVE poskytují cenné informace o funkčním dopadu jednotlivých variant, které lze využít při jejich klinické interpretaci. Pro zajištění transparentního přístupu k těmto datům byla vytvořena databáze MAVEdb, která slouží jako centrální úložiště funkčních skóre jednotlivých variant z různých MAVE studií [85].

2. Cíle práce

Disertační práce se zaměřuje na identifikaci patogenních variant vybraných kandidátních nádorových predispozičních genů pomocí sekvenování nové generace, prioritizaci a funkční anotaci variant nejasného významu (VUS) pomocí RNA analýz a funkčních analýz *in vitro*.

Konkrétně jsme se zaměřili na:

1. **Vyšetření nádorové predispozice u vysoce rizikových pacientů** včetně nemocných s hepatocelulárním karcinomem, velmi mladých dospělých žen s karcinomem ovaria, pacientek s karcinomem endometria, pacientů s karcinomem prsu u mužů. Nízce penetrantní alely v podobě PRS jsme vyšetřili ve skupině žen s karcinomem prsu a ovaria bez přítomnosti zárodečných variant v klinicky významných nádorových predispozičních genech. Systematicky jsme se věnovali zárodečným alteracím v genech kódujících proteiny MRN komplexu z důvodu populačně-specifického vysokého výskytu varianty c.657del5 genu *NBN* v naší populaci.
2. **Optimalizaci využití RNA analýz pro účely diagnostiky nádorové predispozice**, pro které jsme optimalizovali automatickou izolaci celkové RNA z lyzátu periferní krve a zavedli souběžnou panelovou NGS analýzu DNA a RNA. Tyto metody jsme následně využili pro identifikaci a charakterizaci nové rekurentní, zárodečné patogenní varianty v genu *CHEK2*.
3. **Klasifikaci VUS ve vybraných kandidátních genech** pomocí funkčních analýz *in vitro* jsme použili pro vyhodnocení zárodečných variant genu *FANCG*, jako možné příčiny dědičné formy karcinomu prsu a ovarii a kategorizaci missense VUS *CHEK2*, sloužící pro jejich funkční klasifikaci.

Výsledky naší práce mohou poskytnout porozumění genetickým predispozicím spojeným s různými typy zhoubných nádorů, což může přispět k lepší klasifikaci, diagnostice či prevenci těchto nádorů v České republice.

3. Metody

Metody využívané v disertační práci jsou detailně popsány v metodických sekcích jednotlivých publikací (**Kapitola 6**).

3.1. Pacienti, kontroly a vzorky genetického materiálu

V rámci publikací zahrnutých v této disertační práci byly použity různé sady pacientů a kontrol detailně popsané v jednotlivých publikacích. Všichni pacienti zahrnutí do analýz měli diagnózu některých ZN a byli geneticky testováni v Laboratoři onkogenetiky (ÚLBD, VFN a 1.LF UK) nebo na jiném spolupracujícím pracovišti v rámci CZE CANCA konsorcia [86]. Všechny testované osoby byly osoby z České republiky a podepsaly informovaný souhlas s genetickým testováním schváleným etickou komisí.

3.2. Cílené sekvenování nové generace DNA a RNA

Analýza vzorků byla prováděna sekvenováním nové generace a sekvenační knihovny byly připraveny dle instrukcí od výrobce s drobnými modifikacemi popsanými v jednotlivých publikacích.

Příprava DNA sekvenační knihovny vyžadovala vstupní množství 200-800 ng genomové DNA izolované z leukocytů periferní krve. Genomová DNA byla enzymaticky či ultrazvukem fragmentována na fragmenty DNA o průměrné délce 200 bp. Tyto fragmenty byly následně zpracovány pomocí kitů KAPA HyperPrep Kit, KAPA HyperPlus Kit a KAPA EvoPlus Kit, dle protokolů od výrobce (Roche).

Pro přípravu RNA sekvenační knihovny bylo použito 5 µl celkové RNA izolované z leukocytů periferní krve. RNA byly rozštěpeny na fragmenty o průměrné délce 180 – 200 bp, které byly zpracovány pomocí kitu KAPA HyperPrep Kit (Roche).

Po fragmentaci a výběru fragmentů o správné velikosti byla provedena ligační PCR (LM-PCR), která připojila na konce fragmentů unikátní set indexů, které umožnily analyzovat vzorky jednotlivých pacientů najednou. Vzorky byly spojovány ve stejném hmotnostním poměru tak, aby celkovém množství analyzované DNA bylo 1,5 – 2 µg.

Dle volby experimentu byla provedena hybridizace s biotinem značenými sondami – KAPA HyperExome panel, KAPA HyperChoice panel CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) a/nebo PRSman (Roche). Po hybridizaci byla knihovna omyta kitem HyperCapture Reagent Kit (Roche).

Finální knihovna byla sekvenována na sekvenátorech NextSeq 500 (2× 75 cyklů), NextSeq 2000 (2× 150 cyklů) nebo NovaSeq 6000 (2× 100 cyklů; Illumina).

3.3. Bioinformatické analýzy

Získaná sekvenační data ve formátu FASTQ byla mapována na referenční genom hg19 programem Novoalign [87]. Vzniklé soubory SAM převedené programem Picard tools [88] na binární formu BAM byly zpracovány pomocí GATK pipeline [89] do souboru VCF, který obsahoval informace pouze o variantních nukleotidech, které byly anotovány za použití nástroje SnpEff [90]. Středně dlouhé inserce a delece (nad 35 bp) byly identifikovány nástrojem Pindel [91] a analýza velkých genových přestaveb byla provedena nástrojem CNVkit [92]. Pro vizualizaci sekvenačních dat v BAM formátu byl použit IGV [93].

3.4. Funkční analýzy

Analýza enzymatické aktivity identifikovaných variant genu *CHEK2* byla provedena v modelovém systému netransformované buněčné linie odvozené od lidských buněk sítnicového epitelu hTERT-RPE1 (ATCC CRL-4000), ve které byl prostřednictvím CRISPR-Cas9 proveden *knock-out* genu *CHEK2*. Do těchto buněk byly transientní transfekcí zavedeny plazmidy pcDNA4-EGFP-FLAG-CHEK2 s variantami *CHEK2* a následně byla měřena schopnost buněk fosforylovat endogenní substrát KAP1 na Ser473 a autofosforylace CHK2 na Ser516. Buňky RPE1-CHEK2-KO, rostoucí na krycích sklíčkách, byly tranzientně transfekovány plazmidem nesoucím jednotlivé studované varianty CHK2 kinázy, kontrolami byla *wild-type* CHK2 kináza, zkrácená a nefunkční varianta c.1100delC a prázdný EGFP plazmid. Den po transfekci byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem, permeabilizovány 0,2% Triton X-100 v PBS a blokovány v 3% BSA v PBS. Fixované buňky byly inkubovány v primární protilátce KAP1-pSer473 (BioLegend) nebo CHK2-pSer516 (Cell Signaling), a následně v sekundární protilátce Alexa568 a DAPI. Po omytí a usušení byla sklíčka připevněna na podložní sklíčko za použití Vectashield H-1000 a snímání signálu bylo provedeno pomocí mikroskopu ScanR (Olympus) objektivem 40×/1,3. Mikroskopická data byla vyhodnocena v programu ScanR Analysis Software (Olympus). Schopnost buněk nesoucích varianty CHK2 fosforylovat substrát KAP1 na Ser473 nebo autofosforylovat CHK2 na Ser516 byla normalizována k *wild-type* kináze CHK2.

Funkční analýza zárodečných variant genu *FANCG* byla provedena v modelovém systému buněčné linie U2OS odvozené od buněk pacienta s osteosarkomem, ve které byl přístupem CRISPR-Cas9 proveden *knock-out* genu *FANCG*. Do U2OS-FANCG-KO buněk byly zaneseny plazmidy pEGFP-C1-FANCG-T2A-Puro s variantami *FANCG* a následně byly vytvořeny stabilní linie exprimující zkoumané varianty *FANCG*. *In vitro* analýza byla založena na hodnocení monoubikvitinylace FANCD2 po ošetření buněk genotoxickým činidlem mitomycinem C (MMC). Dále byla hodnocena schopnost tvorby kolonií (*colony formation assay*) po 7mi denní expozici buněk 1nM MMC. Následně byly stabilní linie buněk U2OS-FANCG-KO nesoucí jednotlivé varianty *FANCG* vystaveny 5 hodinovému působení 2μM MMC a

prostřednictvím Western blotu byla imunochemicky hodnocena monoubikvitinylace FANCD2 (Abcam, ab108928). Pro kvantitativní hodnocení signálu FANCD2 v jaderných ohniscích, který odpovídá aktivitě FANCG, byla využita fluorescenční mikroskopie. Stabilní linie buněk exprimující zkoumané varianty rostly na krycích sklíčkách a druhý den byly po dobu 5 hodin vystaveny působení 2 μ M MMC. Následně byla provedena pre-extrakce na ledu a fixace 4% paraformaldehydem, permeabilizace 0,5% Triton X-100 v PBS, blokování v 1% BSA v PBS, inkubace v primární protilátce FANCD2 (Abcam) a sekundární protilátce Alexa568 a DAPI. Po omytí a usušení byla sklíčka připevněna na podložní sklíčko za použití Vectashield H-1000 a snímání signálu bylo provedeno pomocí mikroskopu ScanR (Olympus) objektivem 60 $\times$ /1,42 OIL. Počet jaderných ohnisek FANCD2 byl vyhodnocen v programu ScanR Analysis Software (Olympus). Ztráta heterozygosity v genu *FANCG* byla hodnocena pomocí NGS panelu 359 genů u vzorků DNA izolovaných z parafrinových bločků s formalinem fixovanou tkání nádorů (FFPE). Ztráta heterozygosity byla analyzována pomocí modulu Copy Number Variant Detection [94] spolu s hodnocením četností detekovaných zárodečných variant v analyzovaném vzorku FFPE.

3.5. Statistické analýzy

Výpočet skóre polygenního rizika (PRS) byl proveden dle publikace Hovhannisyan *et al.* [95]. HLA typizace byla provedena z dat exomového sekvenování DNA s využitím nástroje specHLA [96].

Pro komplexní vyhodnocení vztahu mezi variantami v genech MRN komplexu a rizikem vzniku nádorových onemocnění byla provedena meta-analýza shromažďující dostupné *case-control* studie. Meta-analýza byla hodnocena pomocí software R s využitím balíčku „meta“. Asociace variant s nádorovým onemocněním bylo vyhodnocováno poměrem šancí výskytu (OR, „*odds ratio*“) s intervalem spolehlivosti 95 % a statistická významnost byla stanovena při hodnotě *p*-hodnota <0,05.

Vzhledem k očekávaným rozdílům ve struktuře pacientů a populací byl pro meta-analýzu vybrán model s náhodnými efekty („*random effect model*“), který umožňoval tuto heterogenitu zohlednit. Heterogenita mezi jednotlivými studiemi byla hodnocena Cochranovým Q-testem a míra heterogenity byla kvantifikována statistikou I^2 ($I^2 < 25$ % nízká heterogenita, $I^2 = 25 - 50$ % mírná heterogenita, $I^2 > 50$ % vysoká heterogenita). Hodnocení míry publikačního zkreslení („*publication bias*“) vybraných studií bylo posuzováno na základě trychtýřového grafu („*funnel plot*“) a kvantifikováno Eggerovým regresním testem (*p*-hodnota < 0,05 signalizovala statisticky významné zkreslení).

K rozšíření meta-analýzy byla provedena sekundární analýza, která k vyhodnocení asociace variant v genech MRN komplexu a nádorových onemocnění zahrnovala i případové studie bez kontrolních skupin. K této analýze byly využity hodnoty z databáze gnomAD verze 2.1.1

(Genome Aggregation Database). Nezávisle na sobě byly použity dvě kontrolní skupiny – skupina neselektované populace a skupina populace bez onkologických pacientů. Pro porovnání frekvencí nosičů patogenních variant byl využit Fisherův exaktní test. V rámci této analýzy byly hodnoceny všechny truncační varianty (*nonsense*, *frameshift* a varianty ovlivňující konsesní sestřihová místa), které byly v databázích ClinVar či LOVD klasifikovány jako patogenní nebo pravděpodobně patogenní.

Tímto statistickým přístupem bylo možné vyčíslit rizika vzniku nádorových onemocnění u pacientů s variantami v genech MRN komplexu.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Vyšetření nádorové predispozice u vysoce rizikových pacientů

4.1.1. Analýza nádorové predispozice u pacientů s hepatocelulárním karcinomem

PŘÍLOHA 1: 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*. 2023; 15(1):201. (IF₂₀₂₃=4.5)

Podíl na studii: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

Dědičná predispozice k ZN jater a intrahepatálních žlučových cest se vyskytuje u pacientů s tímto onemocněním spíše vzácně. Nicméně v roce 2022 byly publikovány dvě studie popisující relativně vysokou četnost nosičů GPV přesahující 10 % u pacientů se ZN jater, kteří byli nosiči variant ve středně a vysoce penetrantních genech spojených se syndromem dědičného karcinomu prsu a/nebo ovaria (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*) nebo Lynchova syndromu (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*) [29, 30].

V naší studii [97] jsme provedli genetickou analýzu nádorové predispozice pomocí panelového NGS u 334 pacientů, kterým byl diagnostikován hepatocelulární karcinom v IKEM. Ačkoliv celkově bylo identifikováno 47 pacientů (14,1 %), kteří byli nosiči 48 patogenních variant v 35 genech (z 226 testovaných nádorových známých a kandidátních predispozičních genů), pouze 7 pacientů (2,1 %) neslo patogenní varianty v známých nádorových kandidátních predispozičních genech (*PMS2*, *NBN*, *FH*, *RET*, **Tabulka 1**). Souhrnná frekvence patogenních variant v nádorových predispozičních genech se u nemocných s ZN jater nelišila od frekvence těchto variant v obecné kontrolní populaci.

Naše výsledky potvrzují dřívější nálezy, které naznačovaly, že podíl nádorové predispozice na vznik ZN jater je malý. Vysoký výskyt zaznamenaný v pracích Uson *et al.* a Mezina *et al.* lze tedy spíše považovat za důsledek rozdílného výběru pacientů s tumory jater, kteří byli retrospektivně identifikováni v rozsáhlých populacích nosičů patogenních variant v nádorových predispozičních genech [29, 30], zatímco v naší studii se jednalo o analýzu pacientů s identifikovaným hepatocelulárním karcinomem. Nízký výskyt nosičů patogenních variant v nádorových predispozičních genech v rámci naší studie je důležitým klinickým nálezem s ohledem na obecnou indikaci pacientů s hepatocelulárními tumory ke germinálnímu testování,

kdy frekvence nosičů nepřesahuje doporučených 10 %. Nicméně genetické testování může mít svůj význam u pacientů s ZN jater, kteří jsou indikováni k transplantaci jater, jelikož u nosičů variant hrozí vysoké riziko vzniku post-transplantačních sekundárních malignit z důvodů trvalé imunosuprese transplantovaných pacientů.

Tabulka 1: Přehled alterací v klinicky významných a kandidátních genech u pacientů s hepatocelulárním karcinomem a v kontrolách. Statisticky významné výsledky jsou vyznačeny tučně, geny našeho dalšího zájmu červeně.

Gen	Nosiči v 334 pacientech; N (%)	Nosiči v 1662 kontrolách; N (%)	OR (95% CI)	Hodnota p
A. Klinicky významné vysoce a středně penetrantní predispoziční geny				
<i>PMS2</i>	1 (0.3)	4 (0.3)	1.2 (0.14–11.11)	0.8
<i>NBN</i>	4 (1.2)	4 (0.3)	5.0 (1.25–20.17)	0.012
<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
<i>Všichni nosiči</i>	7 (2.1)	10 (0.6) ¹	-	-
B. Kandidátní predispoziční geny				
<i>DMBT1</i>	3 (0.9)	2 (0.1)	7.5 (1.25–45.13)	0.010
<i>RAD50</i>²	3 (0.9)	3 (0.2)	5.0 (1.01–24.90)	0.029
<i>ATRIP</i> ²	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>	2 (0.6)	1 (0.1)	10.0 (0.91–110.48)	0.021
<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
<i>Všichni nosiči</i>	40 (12.0)	104 (6.3) ¹	-	-

¹ Zobrazeny jsou pouze geny, u kterých byly identifikovány patogenní varianty ve skupině pacientů. ² Pacient nesoucí souběžně alterace v *RAD50* and *ATRIP*. n.d.: nedefinováno.

Zvláštní pozornosti se v této studii dostalo variantám v genech MRN komplexu. Celkově nejčastěji pozorovanou variantou byla rekurentní slovanská zakladatelská varianta c.657del5 v genu *NBN*, která byla detekována u 4/334 pacientů (1,2 %), a u 3/334 pacientů (0,9 %) byla nalezena patogenní varianta v *RAD50*. Riziko vzniku HCC bylo v porovnání s kontrolní skupinou v obou případech významně zvýšené – *NBN*: OR = 5,0; 95%CI: 1,2–20,17; $p = 0,012$ a *RAD50*: OR = 5,0; 95%CI: 1,01–24,90; $p = 0,029$. Výskyt zárodečných variant v *NBN* byl již dříve pozorován u cirhotických pacientů s diagnostikovaným ZN jater a u pacientů s chronickou

hepatitidou B [99, 100]. *In vivo* byla na myších modelech studována zvýšená tvorba nádorů jater u *Nbn* hemizygotních myší [101].

Naše výsledky v kontextu s výsledky již provedených studií naznačují možnou účast MRN dysfunkce komplexu, a to zejména *NBN* na vzniku hepatocelulárního karcinomu, je však zapotřebí dalšího výzkumu, a to zejména studia patogeneze tohoto onemocnění a rozsáhlé analýzy pacientů diagnostikovaných ZN jater.

4.1.2. Analýza PRS u pacientek s nádory prsu

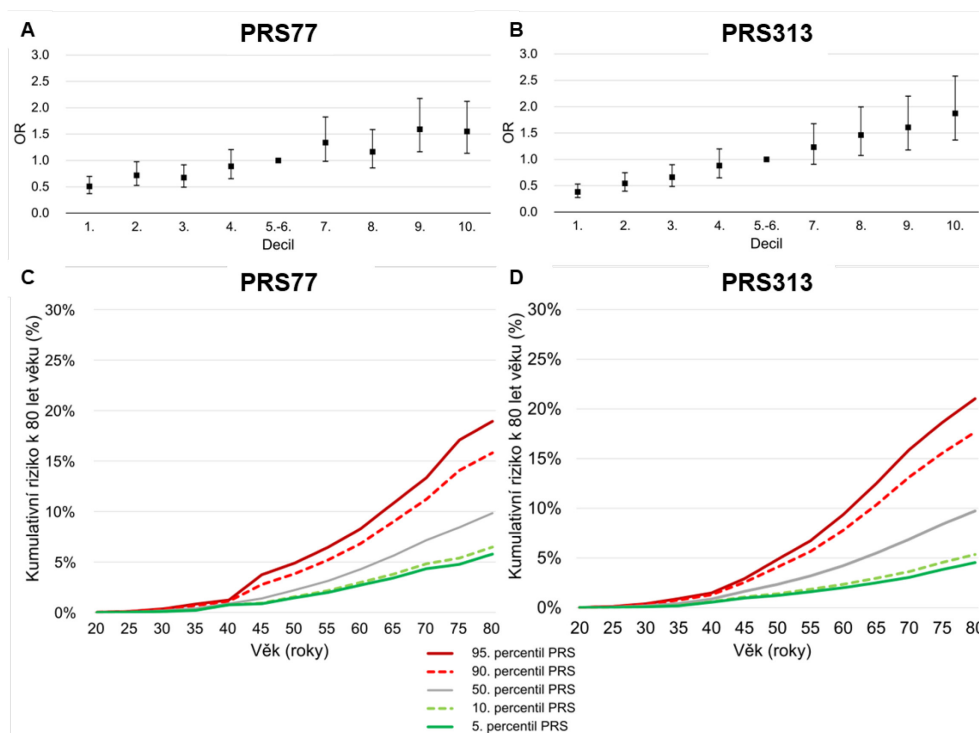
Hovhannisyan M, Zemankova P, Nehasil P, Matejkova K, Borecka M, Cerna M, Dolezalova T, Dvorakova L, Foretova L, Horackova K, Jelinkova S, Just P, Kalousova M, Kral J, Machackova E, Nemcova B, Safarikova M, Springer D, [Stastna B](#), Tavandzis S, Vocka M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Ernst C, Kleibl Z, Janatova M. **Population-specific validation and comparison of the performance of 77- and 313-variant polygenic risk scores for breast cancer risk prediction.** *Cancer*. 2024 May 8. doi: 10.1002/cncr.35337. (IF₂₀₂₃=6.1)

Podíl na studii: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, analýza kontrolního souboru, editování manuskriptu

Nádory prsu jsou nejrozšířenějším onkologickým onemocněním v populaci žen. Celoživotní kumulativní riziko přesahuje 10 % [102]. Většina případů nádorů prsu je sporadického původu, avšak 5-10 % diagnóz vzniká v důsledku přítomnosti zárodečných patogenních variant v genech s vysokou a střední penetrancí (**Kapitola 1.3**). Přibližně 80 % pacientek s nádory prsu a pozitivní rodinnou anamnézou však nenese patogenní varianty ve známých nádorových predispozičních genech [12]. Nedávno provedené GWAS analýzy naznačují, že část dědičnosti je způsobena vzájemným působením více variant v genech s nízkou penetrancí, obvykle jednonukleotidových polymorfismů [103, 104]. Kombinovaná rizika těchto variant, označovaná jako skóre polygenního rizika (PRS; Kap. 1.6) pak může vést k překročení prahových hodnot rizik pro střední (RR > 2) nebo dokonce vysoké (RR > 4) riziko [105, 106]. Odhaduje se, že polygenní dědičnost představuje až 18 % doposud nevysvětlené části pacientek, které mají pozitivní rodinnou anamnézu [107].

V rámci naší studie bylo vyšetřeno 1329 pacientek s ZN prsu a 1324 kontrol bez patogenních variant v nádorových predispozičních genech. Oba soubory byly analyzovány nejprve panelem CZEKANCA a nosičky příčinných alterací ve známých nádorových predispozičních genech byly vyloučeny z dalších analýz. Vyšetření nízkopenetrantních variant probíhalo na dvou PRS setech obsahujících 77 a 313 variant – PRS77 a PRS313.

Distribuce standardizovaného PRS pacientek s ZN prsu a kontrol se u obou setů výrazně lišila ($p < 2,2 \times 10^{-16}$). Patientky v horním decilu PRS měly ve srovnání s pacientkami v středním kvintilu významně vyšší riziko vzniku ZN prsu (PRS77: OR = 1,55; $p < 0,001$; PRS313: OR = 1,87; $p < 0,001$). Patientky v horních 2,5 % PRS313 měly dokonce riziko vzniku ZN prsu třikrát vyšší (OR = 3,05; $p < 0,001$). V rámci kontinuálního rizika byl set PRS313 (HR per SD = 1,64; $p < 0,001$) spolehlivější než PRS77 (HR per SD = 1,40; $p < 0,001$). Celoživotní riziko vzniku ZN prsu u žen v 95. percentilu je dle PRS313 vzhledem k obecné populaci více než dvojnásobné, což odpovídá riziku nosiček patogenních variant ve středně penetrantních genech (**Obrázek 5**).



Obrázek 5: Asociace mezi decily PRS77 (A) a PRS313 (B) s ZN prsu nezávisle na věku a predikované kumulativní riziko vzniku ZN prsu v závislosti na percentilové kategorii pro PRS77 (C) a PRS313 (D).

Výsledky práce ukázaly, že oba sety PRS77 i PRS313 jsou schopny stratifikovat jedince podle rizika vzniku ZN prsu v české populaci, i když jednotlivé alely byly identifikovány na GWAS souborech bez zastoupení slovanské populace. Jako spolehlivější ukazatel pro stratifikaci rizika v naší populaci vychází set PRS313. Naše výsledky podporují potenciální klinickou užitečnost použití PRS skóre pro individualizovanou predikci vzniku ZN prsu. Do budoucna by bylo možné uvažovat o setu PRS313 jako doplňkovém nástroji pro identifikaci žen, pro které by bylo vhodné brzké nasazení preventivní péče.

4.1.3. Analýza nádorové predispozice u mladých patientek se ZN ovaria

Horackova K, Zemankova P, Nehasil P, Vocka M, Hovhannisyan M, Matejkova K, Janatova M, Cerna M, Kleiblova P, Jelinkova S, [Stastna B](#), Just P, Dolezalova T, Nemcova B, Urbanova M, Koudova M, Hazova J, Machackova E, Foretova L, Stranecky V, Zikan M, Kleibl Z, Soukupova J. **A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer.** *Sci Rep.* 2024 Jul 13;14(1):16183. (IF₂₀₂₃=3.8)

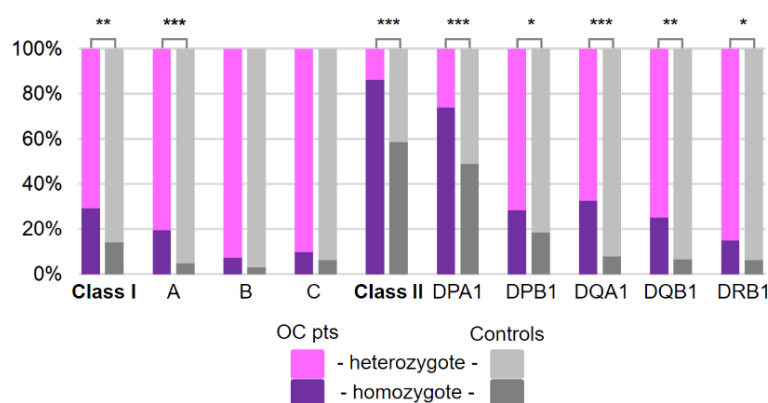
Podíl na studii: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

Karcinom ovaria patří mezi gynekologická nádorová onemocnění s nejhorší prognózou a vysokou mortalitou [108, 109]. Celoživotní kumulativní riziko ZN ovarii se pohybuje okolo 1,3 % [110]. ZN ovaria je onemocnění s velmi významnou dědičnou komponentou a záchytnost GPV v nádorových predispozičních genech dosahuje 25 % [19]. Karcinom ovaria vzniká nejčastěji u žen mezi 55. – 74. rokem života a průměrný věk diagnózy je 63 let. Podskupina patientek s ZN ovaria diagnostikovaných ve věku ≤ 30 let (tzv. s časným nástupem) představuje samostatnou minoritní podskupinu, která však vykazuje odlišné klinickopatologické charakteristiky od patientek s pozdním nástupem onemocnění, včetně atypicky nízké genetické predispozice k vzniku nádorových onemocnění [108].

V naší studii jsme provedli germinální genetické testování 123 patientek s časným nástupem ZN ovaria. Provedli jsme celoxomové sekvenování na úrovni DNA a RNA s HLA typizací a hodnocením PRS. Pouze 6/123 (4,9 %) patientek s časným nástupem ZN ovaria neslo zárodečnou patogenní variantu ve známých vysoce penetrantních genech predisponujících k ZN ovaria, z toho pouze dvě patientky byly nosičkami patogenních variant v hlavních predispozičních genech *BRCA1/2* (2/123; 1,6 %). Tyto výsledky jsou v souladu s několika málo literárními zmínkami dokumentujícími, že záchyt patogenních variant ve vysoce penetrantních predispozičních genech ZN ovaria u velmi mladých dospělých žen je velmi nízký [97]. Námi provedená komplexní analýza patientek s časným nástupem ZN ovaria nadto odhalila dva možné alternativní směry potenciální dědičnosti. Zaprvé se jednalo o možnou dědičnost ZN ovaria podobnou dědičnosti ZN prsu. Tato hypotéza byla podpořena výsledky „over-representation“ analýzy ukázaly souvislost s zvýšeným zastoupením patogenních variant v genech asociovaných s karcinomem prsu. Tento první směr možné predispozice podpořilo i zjištění, že u patientek s časným nástupem ZN ovaria byla pozorována zvýšená frekvence patogenních variant v genu *CHEK2* ($p = 1,2 \times 10^{-4}$), známém středně penetrantním predispozičním genu k ZN prsu i dalších nádorových onemocnění [111]. Patogenní varianty genu *CHEK2* byly již dříve u patientek se ZN ovaria obecně [19, 112] i u patientek s časným nástupem ZN ovaria popsány [113], nicméně *CHEK2* zatím není s ZN ovaria jasně spojován. Podobnost v dědičnosti ZN ovaria s časným nástupem a ZN prsu byla potvrzena také pomocí PRS analýzy, kdy setu PRS313 dokázal úspěšně

stratifikovat pacientky s časným nástupem od kontrol ($p = 0,03$), přičemž tento PRS set je standardně určen pro stratifikaci žen s karcinomem prsu [114]. Druhá cesta ukazovala vztah ZN ovaria s časným nástupem se zhoršenou protinádorovou imunitní odpovědí. Konkrétně jsme našli několik genetických alterací ovlivňujících genotypovou heterogenitu hlavního histokompatibilního systému (MHC, u lidí označováno také jako HLA „human leukocyte antigen“). U vyšetřovaných patientek s časným ZN ovaria jsme identifikovali zvýšenou četnost patogenních variant v genu *LY75-CD302* ($p = 8,3 \times 10^{-4}$), který je zapojený v imunitní odpovědi a antigenní prezentaci. Dále jsme provedli HLA typizaci 8 klinicky významných lokusů, jelikož asociace s nosičstvím určitých HLA alel nebo genotypů byla již dříve u patientek s ZN ovaria popsána [115]. Ve srovnání s kontrolami jsme u patientek s časným nástupem ZN ovaria zvýšenou HLA homozygotitu ($p = 3 \times 10^{-7}$) (**Obrázek 6**) a zvýšenou frekvenci výskytu alely HLA-DRB1*11:01 (11,6 %; $p = 0,003$), asociovanou v předchozích studiích se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu [116]. Kromě toho jsme u patientek pozorovali významně vyšší zárodečnou mutační zátěž než u kontrol ($p = 3 \times 10^{-4}$).

Naše výsledky ukázaly, že genetická predispozice k časnému nástupu ZN ovaria je komplexním procesem, který přesahuje tradiční mendelovské monogenní chápání dědičnosti a významnou roli v této dědičnosti patrně hraje imunitní systém.



Obrázek 6: Frekvence homozygotů a heterozygotů v HLA lokusech u 123 patientek s časným nástupem ZN ovaria. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 10^{-5}$. HLA, lidské leukocytární antigeny; OC pts, pacientky s nádory ovaria. Převzato z [117]

Kromě nálezů patogenních variant ve výše uvedených známých predispozičních genech jsme pomocí WES identifikovali rovněž další trunkační a sestřihové varianty v genech s nejasným vztahem ke vzniku karcinomu ovaria. Mezi nimi byly zaznamenány dvě varianty v genech našeho zájmu: *NBN:c.188delT* (p.Ile63fs) a *FANCG:c.1642C>T* (p.Arg548*). Patogenní varianty v genech FA komplexu (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C*) jsou spojovány s vysokým a středním rizikem vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria. Nicméně funkční analýzy studující varianty genu *FANCG*, který je také součástí FA komplexu, nepotvrdily jeho asociaci s karcinomem ovaria [70, 98]. Ani gen *NBN* není spojován s klinicky významně zvýšeným

rizikem ZN ovaria, avšak meta-analýzy ukázaly, že riziko vzniku karcinomu ovaria je zvýšeno dvakrát u nosiček patogenních variant *NBN* [98, 118]. Vzhledem k nízké frekvenci GPV v *FANCG* a *NBN* u pacientek s časným ZN ovaria je však potřeba tyto poznatky dále ověřit na větším patientském souboru.

4.1.4. Analýza nádorové predispozice u pacientek s nádory endometria

Kral J, Jelinkova S, Zemankova P, Vocka M, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Dostalek L, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Chvojka S, Kalousova M, Kosarova M, Koudova M, Krutilkova V, Machackova E, Nehasil P, Novotny J, [Otahalova B](#), Puchmajerova A, Safarikova M, Slama J, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Zikan M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Kleibl Z, Janatova M. **Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer.** *Oncol Lett* 2023. 25(6): 216. (IF₂₀₂₃=2.5)

Podíl na studii: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

Zhoubné nádory endometria jsou nejčastějšími gynekologickými malignitami [119]. V současné době je dědičná forma ZN endometria spojována především s geny Lynchova syndromu (*MLH1*, *MSH2/EPCAM*, *MSH6*, *PMS2*), pro který je výskyt ZN endometria typickým znakem. Pacientky s variantami v genech LS mají 40 – 60% pravděpodobnost, že karcinom endometria bude první nádor, který se u nich vyvine [120].

Naše práce se zabývala genetickým testováním 527 pacientek s nádory endometria. Z nich 254 splňovalo indikační kritéria pro genetické testování Lynchova syndromu, syndromu dědičného karcinomu prsu a/nebo ovaria (HBOC) a obou těchto syndromů (LS + HBOC).

Celkem 60 pacientek (11,4 %) neslo GPV ve 12 genech spojených se známou predispozicí k ZN endometria (**Tabulka 2**) a frekvence těchto variant byla 4× vyšší než u populačních kontrol (2,8 %). Nosiček GPV v genech LS bylo celkem 27/527 (5,1 %) což potvrzuje, že tyto varianty představují vysoce rizikový faktor ke vzniku ZN endometria (OR = 22,4; 95%CI: 7,8 – 64,3; $p = 1,8 \times 10^{-17}$) a námi nalezené riziko vzniku ZN endometria u nosiček GPV v LS genech se shoduje se studií La Duca *et al.* (OR = 20,1) [121]. Nejčastěji alterovanými geny LS byly *MSH6*, *MLH1* a *MSH2*, zatímco v genech *PMS2* ani *EPCAM* patogenní varianty nalezeny nebyly.

Nosiček patogenních variant v genech HBOC bylo celkem 35/527 (6,6 %), přičemž nejčastěji alterovanými geny byly *BRCA1* (11/35; OR = 3,9; $p = 0,001$), *BRCA2* (7/35; OR = 7,4; $p = 0,002$) a *CHEK2* (6/35; OR = 3,2; $p = 0,004$). Ukázalo se, že všechny tři geny signifikantně zvyšují riziko vzniku ZN endometria, avšak v porovnání s rizikem nosiček variant v genech LS bylo toto riziko nižší. U 11 % pacientek byly nalezeny heterozygotní patogenní varianty v dalších kandidátních genech, nejčastěji *FANCA* (4/467; 0,8 %) a *MUTYH* (5/467; 1,1 %), u kterých se však frekvence variant u pacientek v porovnání s frekvencí v kontrolách nijak významně nelišily. Výjimku tvořily agregované frekvence variant v genech pro DNA polymerázy *POLE/POLD1* (OR = 10,44; $p = 0,01$). Z literatury je známo, že patogenní zárodečné missense varianty v exonukleázové doméně *POLE* a *POLD1* asociují s predispozicí k vzniku ZN endometria [26] a patogenní somatické varianty v *POLE* jsou známým prognostickým markerem ZN endometria [122, 123]. V našich analýzách jsme však v těchto genech identifikovali zárodečné varianty zkracující proteinový produkt, o nichž není známo, že by přispívaly ke zvýšenému riziku onemocnění.

Patogenní varianty byly nalezeny i ve všech třech genech MRN komplexu v *MRE11* (1/467; 0,2 %), *RAD50* (8/467; 0,5 %) a *NBN* (2/467; 0,4 %). Riziko vzniku ZN endometria bylo možné vyhodnotit pouze v případě *NBN* (OR = 1,0; 95%CI: 0,2 – 4,7 %; $p > 0,9$), u něhož se ukázalo, že riziko ZN endometria se u nosiček těchto variant nezvyšuje. Toto je v souladu i s námi provedenou meta-analýzou dosud publikovaných studií, která ukázala, že patogenní varianty v *NBN* nezvyšují riziko vzniku ZN endometria [98].

Tabulka 2: Přehled alterací v hlavních predispozičních genech u pacientek s nádory endometria. Statisticky významné výsledky jsou vyznačeny tučně.

Skupina genů	Gen	Skupiny dle indikačních kritérií				Všechny EC pacientky N=527 (%)	PMC N=1662 (%)	Všechny EC pac vs PMC OR (95%CI); p -hodnota
		LS	HBOC	LS+ HBOC	Neindikované			
		N=151 (%)	N=16 (%)	N=82 (%)	N=278 (%)			
Lynchův syndrom (LS)	<i>MLH1</i> *	3 (2,0)	0	2* (2,4)	1 (0,4)	6* (1,1)	1 (0,06)	19,1 (2,3-159,1); 1,3×10⁻⁴
	<i>MSH2</i> *	6* (4,0)	0	2 (2,4)	0	8* (1,5)	0	n.d.
	<i>MSH6</i>	8 (5,3)	0	1 (1,2)	4 (1,4)	13 (2,4)	0	n.d.
	<i>PMS2</i>	0	0	0	0	0	3 (0,18)	n.d.
	<i>EPCAM</i>	0	0	0	0	0	0	n.d.
HBOC	Všechny LS	17 (11,3)	0	5 (6,1)	5 (1,8)	27 (5,1)	4 (0,24)	22,4 (7,8-64,3); 1,8×10⁻¹⁷
	<i>ATM</i> *	1* (0,7)	0	1 (1,2)	3 (1,1)	5* (1,0)	7 (0,42)	2,3 (0,2-7,2); 0,2
	<i>BARD1</i>	0	0	1 (1,2)	0	1 (0,2)	0	n.d.
	<i>BRCA1</i> *	2 (1,3)	2 (12,5)	6* (7,3)	1 (0,4)	11* (2,1)	9 (0,54)	3,9 (1,6-9,5); 0,001
	<i>BRCA2</i>	1 (0,7)	1 (6,3)	0	5 (1,8)	7 (1,3)	3 (0,18)	7,4 (1,9-28,9); 0,002
	<i>BRIP1</i>	0	0	0	1 (0,4)	1 (0,2)	3 (0,18)	1,1 (0,1-10,1); 1,0
	<i>CDH1</i>	0	0	0	0	0	0	n.d.
	<i>CHEK2</i>	3 (2,0)	0	1 (1,2)	2 (0,7)	6 (1,1)	6 (0,36)	3,2 (1,0-9,9); 0,04
	<i>NF1</i>	0	0	0	0	0	1 (0,06)	n.d.
	<i>PALB2</i>	1 (0,7)	0	0	0	1 (0,2)	8 (0,48)	0,4 (0,1-3,1); 0,4
	<i>PTEN</i>	1 (0,7)	0	0	0	1 (0,2)	1 (0,06)	3,2 (0,2-50,5); 0,4
	<i>RAD51C</i>	0	0	2 (2,4)	0	2 (0,4)	2 (0,12)	3,2 (0,4-22,5); 0,2
	<i>RAD51D</i>	0	0	0	0	0	0	n.d.
	<i>STK11</i>	0	0	0	0	0	0	n.d.
	<i>TP53</i>	0	0	0	0	0	2 (0,12)	n.d.
	Všechny HBOC	9 (6,0)	3 (18,8)	11 (13,4)	12 (4,3)	35 (6,6)	42 (2,53)	2,7 (1,7-4,3); 7,9×10⁻⁵
Všechny PV		26	3	16	17	62	46	
Všechny nosičky		25* (16,6)	3 (18,8)	15* (18,3)	17 (6,1)	60* (11,4)	46 (2,78)	

* Nosičky dvou PV v genech *MLH1/BRCA1* a *MSH2/ATM*. n.d., nedefinováno

4.1.5. Analýza nádorové predispozice u mužů s karcinomem prsu

Janatová M, Borecká M, Zemánková P, Matějková K, Nehasil P, Černá L, Černá M, Dušková P, Doležalová T, Foretová L, Havránek O, Házová J, Horáčková K, Hovhannisyan M, Hrušková L, Chvojka Š, Janíková M, Kalousová M, Kosařová M, Koudová M, Krhutová V, Krulišová V, Macháčková E, Michalovská R, Němcová B, Novotný J, Šafaříková M, **Šťastná B**, Stránecký V, Šubrt I, Tavandzis S, Vlčková Z, Vočka M, Vrtěl R, Zima T, Soukupová J, Kleiblová P, Kleibl Z. **Genetic Predisposition to Male Breast Cancer**. *Folia Biol (Praha)*. 2024;70(5-6):274-284. (IF₂₀₂₃=1.1)

Podíl na studii: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, konfirmace nalezených variant, editování manuskriptu

Karcinom prsu je u mužů velmi vzácnou diagnózou a představuje méně než 1 % diagnostikovaných onkologických onemocnění u mužů. Vzhledem k nízké prevalenci tohoto onemocnění je karcinom prsu u mužů velmi podhodnocené onemocnění. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu se v obecné populaci pohybuje okolo 0,1 %. U 15 % mužů s diagnostikovaným karcinomem prsu je nalezena dědičná příčina [17]. U mužů dominují zárodečné varianty v genu *BRCA2* a vůči běžné populaci u mužů zvyšují riziko vzniku ZN prsu až 80× [17, 18].

V naší studii bylo provedeno genetické testování u 248 českých mužů s karcinomem prsu. Identifikováno bylo 46 nosičů (18,5 %) patogenních variant v známých predispozičních genech. Přítomnost patogenních variant v těchto genech významně zvyšuje riziko vzniku mužského karcinomu prsu *BRCA2* (34/248; 13,7 %; OR = 44,04; $p = 2,7 \times 10^{-31}$), *BRCA1* (7/248; 2,8 %; OR = 5,82; $p = 0,009$) a *PALB2* (5/248; 2,0 %; OR = 8,26; $p = 0,015$) (**Tabulka 3**). Tyto hodnoty jsou v souladu s předchozími studiemi zaměřujícími se na predispoziční geny karcinomu prsu u mužů, které uvádí, že 7 – 25 % pacientů jsou nosiči *BRCA2* variant [124-126]. V případě genů *BRCA1* a *PALB2* je frekvence variant méně častá a předešlá studie Rizzolo *et al.* 2013 vyčíslila prevalenci *BRCA1* variant na 0 – 4 % s kumulativním rizikem vzniku ZN prsu 4× vyšším, než je v obecné populaci (okolo 0,4 %) [127]. Podobná frekvence (22,4 %) těchto hlavních predispozičních genech byla nalezena u českých pacientů s karcinome prsu ve studii Bielčíkové *et al.* 2024 [128].

Kromě nálezů patogenních variant v hlavních predispozičních genech byly nalezeny varianty i v 16 kandidátních genech (**Tabulka 3**). Signifikantně zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu bylo však pouze u nosičů variant v genu *CHEK2* (7/248; 2,8 %; OR = 4,98; $p = 0,021$). Patogenní varianty byly nalezeny i v genech MRN komplexu, konkrétně v genech *NBN* (1/248; OR = 0,86; $p = 1$) a *RAD50* (1/248; OR = 1,46; $p = 1$). Nicméně jejich četnost je velmi nízká a význam těchto variant zůstává nejasný.

Tabulka 3: Rizika spojená s patogenními variantami v genech predisponujících ke karcinomu prsu u mužů. Statisticky významné výsledky jsou vyznačeny tučně, geny MRN komplexu, ve kterých byly nalezeny patogenní varianty, červeně.

Gen	Nosiči v 248 pacientech; N (%)	Nosiči v 3626 kontrolách; N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i> hodnota	<i>p_{adj}</i> hodnota
<i>BRCA1</i>	7 (2,8)	18 (0,5)	5,82 (2,03–14,77)	0,0007	0,009
<i>BRCA2</i>	34 (13,7)	13 (0,4)	44,04 (22,25–92,33)	1,9×10⁻³¹	2,7×10⁻³⁰
<i>PALB2</i>	5 (2)	9 (0,2)	8,26 (2,16–27,71)	0,001	0,015
Všechny hlavní geny	46 (18,5)	40 (1,1)			
<i>ATM</i>	2 (0,8)	23 (0,6)	1,27 (0,14–5,20)	0,67	1
<i>BLM</i>	1 (0,4)	20 (0,6)	0,73 (0,02–4,60)	1	1
<i>BRIP1</i>	1 (0,4)	6 (0,2)	2,44 (0,05–20,25)	0,37	1
<i>CHEK2^a</i>	10 (4)	21 (0,6)	7,2 (2,99–16,20)	0,00001	0,0001
<i>CHEK2^b</i>	7 (2,8)	21 (0,6)	4,98 (1,77–12,32)	0,0015	0,021
<i>FANCM</i>	2 (0,8)	19 (0,5)	1,54 (0,17–6,45)	0,39	1
<i>NBN</i>	1 (0,4)	17 (0,5)	0,86 (0,02–5,53)	1	1
<i>RAD50</i>	1 (0,4)	10 (0,3)	1,46 (0,03–10,36)	0,52	1
<i>SLX4</i>	1 (0,4)	4 (0,1)	3,66 (0,07–37,17)	0,28	1
Všechny kandidátní geny ^b	16 (6,5)	120 (3,3)			

Riziko spojené s *CHEK2* bylo počítáno (a) včetně a (b) vyloučením double nosičů PV variant *BRCA2* + *CHEK2*.

Naše výsledky dokumentují vysokou frekvenci patogenních variant v hlavních i kandidátních predispozičních genech pro mužský karcinomu prsu (25 %) a ukazují, že národní i mezinárodní doporučení pro genetické testování všech mužů s karcinomem prsu jsou odůvodněná [129, 130].

4.1.6. Význam MRN komplexu a analýzy jeho genů (review)

[Otahalova B](#), Volkova Z, Soukupova J, Kleiblova P, Janatova M, Vocka M, Macurek L, Kleibl Z, **Importance of Germline and Somatic Alterations in Human MRE11, RAD50, and NBN Genes Coding for MRN Complex**, *Int J Mol Sci*, 2023; 24(6):5612, (IF₂₀₂₂ =4,9)

Podíl na studii: literární rešerše, *in silico* modelování, příprava a finální úprava rukopisu

Analýza genů MRN komplexu a interpretace nalezených variant je náročná vzhledem ke složitosti protein-proteinových interakcí MRN komplexu, jeho interakcím s dalšími proteiny zapojenými do odpovědi na poškození DNA a neúplnému objasnění jeho biologických funkcí.

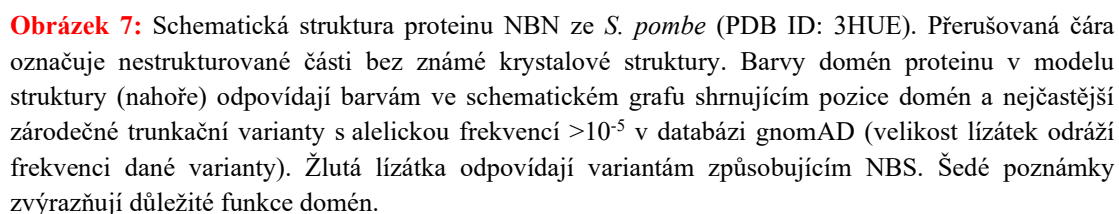
Pro usnadnění interpretace zárodečných a somatických variant identifikovaných v genech MRN komplexu jsme v přehledovém článku [36] připravili přehled strukturních charakteristik jednotlivých proteinových produktů, funkcí lidského MRN komplexu a prevalence zárodečných a somatických variant spojených s různými patologickými stavy.

Lidské geny *MRE11*, *RAD50* a *NBN* kódují proteiny jaderného MRN komplexu, který detekuje dvouřetězcové zlomy DNA, přispívá k opravě DNA a podporuje aktivaci buněčných signálních drah, které organizují odpověď na DNA poškození [131]. Změny v genech kódujících proteiny MRN komplexu byly identifikovány u jedinců s různými patologickými stavy, včetně autozomálně recesivních dědičných syndromů nebo nádorových onemocnění [132].

Bialelické inaktivace genů MRN komplexu jsou spojeny s vzácnými autozomálně recesivními syndromy jejichž klinické charakteristiky se částečně překrývají (**Tabulka 4**). Nejčastějším syndromem spojeným s bialelickou inaktivací proteinů MRN komplexu je **Nijmegen breakage syndrom** (syndrom Seemanové, OMIM: #251260). Více než 90 % pacientů s patogenními variantami v *NBN* pochází ze slovanských východoevropských populací. Tito nosiči jsou typicky homozygotní pro rekurentní slovanskou zakladatelskou variantu *NBN*:c.657del5 v exonu 6 a lze je nalézt ve všech slovanských populacích [133]. Zvláště vysoká frekvence heterozygotů (0,5–1 %) lze nalézt ve Slovanských populacích z České republiky, Polska, Ukrajiny, Bulharska a Lužických Srbů v Německu [48, 134]. Tato varianta je hypomorfní variantou, která způsobuje částečnou ztrátu funkce NBN proteinu a vznik dvou fragmentů NBN proteinu s částečně zachovanou funkcí [48, 135]. U NBS pacientů bylo identifikováno dalších 10 truncačních variant vedoucích k produkci zkráceného proteinového produktu NBN. Všechny tyto varianty se nachází mezi exony 6 a 10 genu *NBN* (**Obrázek 7**) [47, 136]. U některých NBS pacientů byl zjištěn mírnější fenotyp v důsledku alternativního sestřihu mRNA, který vyštěpí exon 6-7 v důsledku posíleného alternativního sestřihového místa [136]. Vzhledem k tomu že zakladatelská varianta c.657del5 je lokalizována v exonu 6, mají tato zjištění důležitý význam pro možnou léčbu NBS pacientů na základě řízeného alternativního sestřihu *NBN*. Autosomálně

Tabulka 4: Fenotypové charakteristiky dědičných AR syndromů způsobené bialelickou inaktivací genu MRN komplexu.

*u dvou nepříbuzných pacientů



40

prsu [15, 56, 142-145], nicméně jejich výsledky byly často protichůdné a klinický význam c.657del5 a dalších heterozygotních patogenních zárodečných variant *NBN* se ukázal jako velmi nejasný. Zárodečné varianty v genu *RAD50* jsou méně časté (~0,2 % pacientů s nádorovým onemocněním) než varianty v *NBN*. Analýzy genu *RAD50* naznačovaly asociaci se zvýšeným rizikem kolorektálního karcinomu [62], nádorů slinivky [63], jater [97] nebo nádorů prsu [65, 146, 147]. Asociace variant v *RAD50* s rizikem vzniku ZN prsu však nebyla potvrzená v žádných studiích kromě studií zaměřených na finskou populaci, pro kterou je typická finská zakladatelská varianta c.687delT, která u zvyšuje riziko vzniku ZN prsu (OR = 4,3) [146]. Zárodečné varianty v *MRE11* jsou velmi vzácné a identifikovány jsou velmi zřídka (<0,1 % pacientů s nádorovým onemocněním). Nejčastěji jsou reportovány u pacientů s ZN prsu [65, 66, 148].

Somatické trunkační varianty v genech MRN komplexu se dle databáze COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) vyskytují velmi zřídka (< 1 % analyzovaných vzorků). Tyto varianty jsou často detekovány ve vzorcích nádorů endometria, gastrointestinálního traktu a kůže. Frekvence somatických missense variant je vyšší a u nádorů prostaty, vaječníků a endometria tvoří až 5 % [149]. Somatické varianty v genech MRN komplexu u pacientů s nádorovými onemocněními naznačují, že tyto geny mohou fungovat jako prognostické faktory a prediktivní biomarkery pro genotoxickou terapii.

Přehledový článek, který byl připraven se spoluautory z různých zdravotnických a výzkumných oborů, se pokusil shrnout biologické a klinické charakteristiky u genů kódujících proteiny MRN komplexu pro široké publikum klinických genetiků, onkologů, a pracovníků diagnostických laboratoří interpretujících nálezy variant v MRN genech při vyšetřeních pacientů v rámci testování germinální DNA.

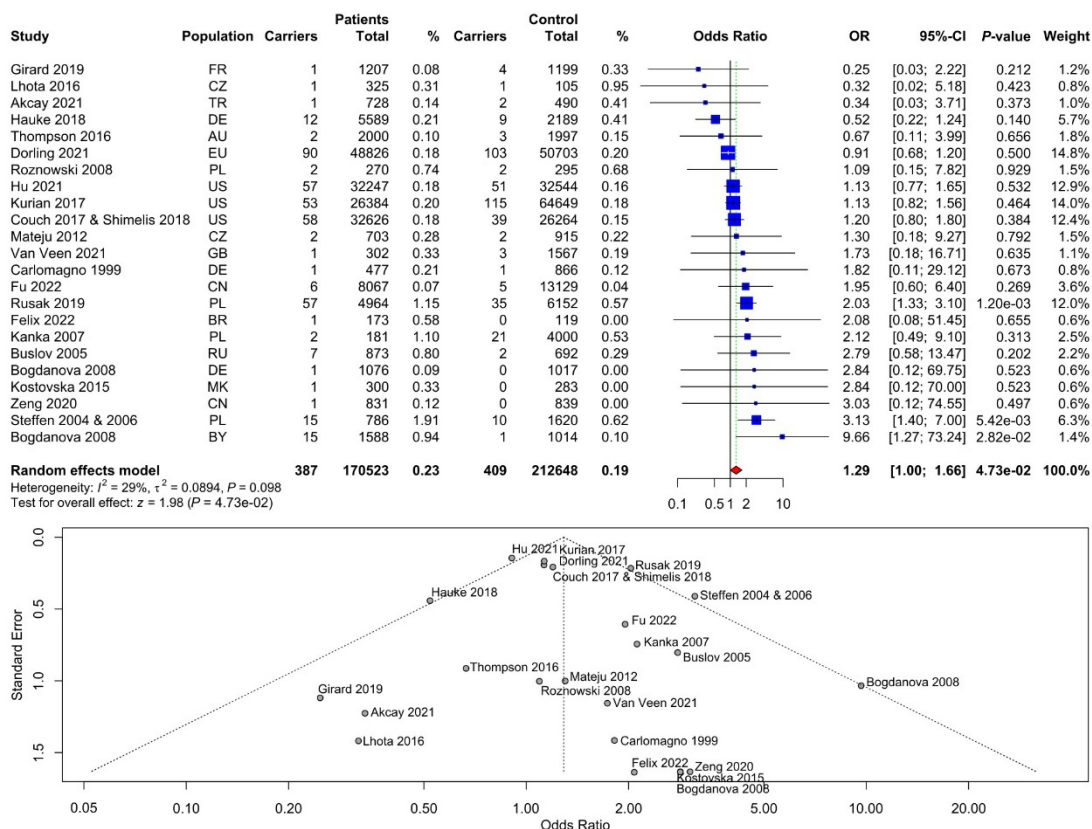
4.1.7. Meta-analýza nádorové predispozice u nosičů patogenních variant v genech MRN komplexu

[Stastna B](#), Dolezalova T, Matejkova K, Nemcova B, Zemankova P, Janatova M, Kleiblova P, Soukupova J, Kleibl Z, **Germline pathogenic variants in the MRE11, RAD50, and NBN (MRN) genes in cancer predisposition: A systematic review and meta-analysis**, *Int J Cancer*, 2024 Jun 26. (IF₂₀₂₃=5,7),

Podíl na studii: literární rešerše, shromáždění a příprava dat, statistická analýza a vyhodnocení, příprava a finální úprava rukopisu.

V návaznosti na přehledový článek týkající se významnosti zárodečných a somatických variant v genech MRN komplexu u heterozygotních nosičů, byla provedena metaanalýza studií analyzujících zárodečné varianty v genech MRN komplexu u pacientů s různými typy nádorových onemocnění. Primárním cílem této práce bylo posoudit riziko vzniku různých nádorových onemocnění u nosičů zárodečných patogenních trunkačních variant na základě systematického hodnocení publikovaných *case-control* studií. Abychom mohli vyhodnotit asociaci variant v genech MRN komplexu s širší škálou různých nádorových onemocnění, provedli jsme sekundární analýzu, která zahrnovala nejen *case-control* analýzy, ale i případové studie bez kontrolních skupin. K vyhodnocení rizik jsme použili jako kontrolní data informace z velké populační databáze gnomAD.

V rámci přípravy jsme na základě klíčových slov identifikovali 758 článků, nicméně pouze 58 publikací splňovalo vhodná kritéria pro zařazení do meta-analýzy, přičemž 47 studií se týkalo variant *NBN*, 14 studií *RAD50* a 9 studií *MRE11*. Z celkových 47 studií týkajících se analýzy genu *NBN* bylo 27 studií zaměřených na **karcinom prsu (Obrázek 8)**. Celkem tak bylo možné pomocí meta-analýzy vyhodnotit, že riziko vzniku karcinomu prsu u 170 523 pacientů a 212 648 kontrol je nízké s marginální i klinickou statistickou významností (OR = 1,29; 95%CI: 1,00–1,66). V sekundární analýze pak bylo možné vyhodnotit data z dalších 36 studií přispívajících dalšími 101 924 pacienty. I rozšířený soubor neprokázal klinicky závažnou asociaci dědičných variant v *NBN* genu se zvýšeným rizikem karcinomu prsu (OR = 1,4; 95%CI: 1,00–1,66). Naše výsledky tak potvrdily výsledek předchozí meta-analýzy Suszynska *et al.* (OR = 1,18; 95%CI: 0,94–1,48) [118] a dvou studií zaměřujících se na pacientky s karcinomem prsu, které nenalezly zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu u nosičů patogenních variant v *NBN* (OR = 0,90 a OR = 1,05) [15, 16]. Náš výsledek byl v souladu s recentní studií Belhadj *et al.* [132], který také nenašel asociaci variant v *NBN* s karcinomem prsu, ale označuje *NBN* jako gen s velkým významem v různých nádorových onemocněních, což potvrzují i výsledky naší meta-analýzy.



Obrázek 8: Graf „forest plot“ znázorňující asociaci patogenních trunkačních variant v genu *NBN* s rizikem vzniku karcinomu prsu (horní část) a *trychtyřový graf* (dolní část) ukazující nízkou heterogenitu mezi jednotlivými studiemi.

V případě **karcinomu ovaria** nebylo nalezeno statisticky významné zvýšení rizika (OR = 1,53; 4 studie; 13 833 pacientů), nicméně sekundární analýza s vyšším počtem pacientů ukázala signifikantně zvýšené, ale klinicky hraničně nízké riziko vzniku tohoto onemocnění (OR = 2,08; +13 studií; +7 427 pacientů) (**Obrázek 9**). Podobné riziko bylo popsáno v meta-analýze Suszynska *et al.* (OR = 2,17; 95%CI: 1,35–3,49) [118].

Námi provedená meta-potvrdila dřívější předpoklady o středně zvýšeném riziku vzniku **karcinomu prostaty** (OR = 2,44; 9 studií; 21 292 pacientů) a ve srovnání se sekundární analýzou (**Obrázek 8**), která přidala pouze tři studie (+847 pacientů), ukázala zřejmě realističtější odhad tohoto rizika, které bylo srovnatelné s rizikem popsaným studií Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1/2* (CIMBA) u variant *BRCA2* (RR = 2,22) [150]. Přítomnost patogenních zárodečných variant *NBN* zvyšuje agresivitu karcinomu prostaty a zvýšené riziko vzniku metastáz [151, 152]. Asociace variant v genu *NBN* s progresí karcinomu prostaty byla rovněž nalezena v meta-analýze Shi *et al.* (OR = 6,38) [153].

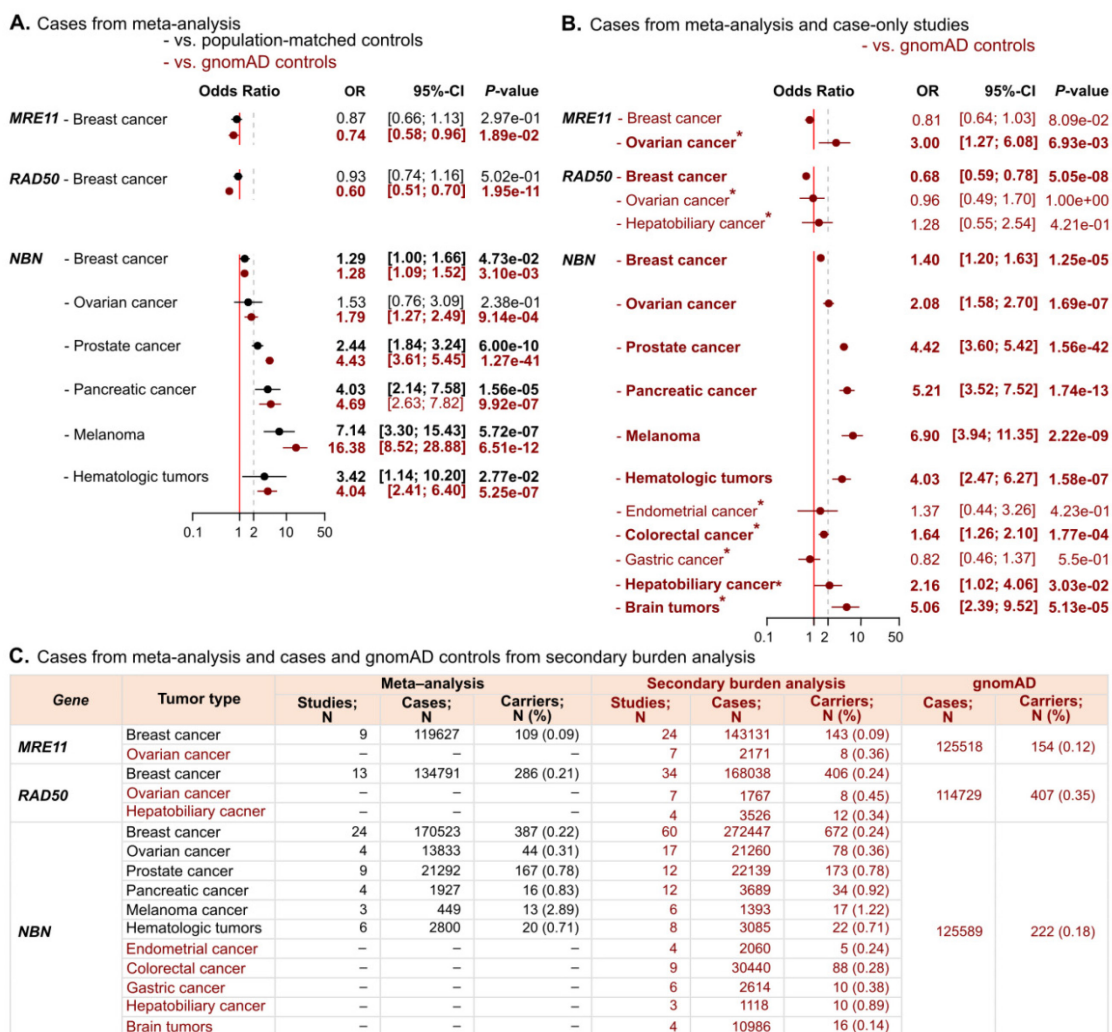
Nosiči patogenních zárodečných variant v *NBN* vykazovali v naší meta-analýze výrazně zvýšené riziko vzniku **karcinomu slinivky** (OR = 4,03; 4 studie; 1 927 pacientů), což bylo potvrzeno i v sekundární analýze (OR = 5,21; +8 studií; +1 762 pacientů) (**Obrázek 9**). Zvýšená frekvence *NBN* variant a somatická ztráta *wild-type* alely ve vzorcích tumorů, byla již dříve

pozorována ve studii Belhadj *et al.* [132]. Námi nalezené riziko vzniku ZN slinivky spojené s variantami *NBN* bylo srovnatelné s riziky v hlavních predispozičních genů – *BRCA1* (OR = 2,58; 95%CI: 1,54–4,05), *BRCA2* (OR = 6,20; 95%CI: 4,62–8,17), *ATM* (OR = 5,71; 95%CI: 4,38–7,33) nebo *PALB2* (RR = 2,37; 95%CI: 1,24–4,50) [154, 155]. Nosiči patogenních variant v těchto genech s jedním nebo více prvostupňovými příbuznými, kteří vyvinuli karcinom slinivky, by měli být považováni za vysoce rizikové jedince indikované k pravidelnému screeningovému vyšetření.

Meta-analýza vyhodnotila zvýšené riziko vzniku **melanomu** (OR = 7,14), avšak vyhodnocení bylo založeno na relativně malém počtu pacientů (3 studie; 449 pacientů). Sekundární analýza (+3 studie; +944 pacientů) zvýšené riziko melanomu potvrdila (OR = 6,90) (**Obrázek 9**), nicméně tento výsledek by měl být interpretován s opatrností z důvodu regionálních a etnických rozdílů mezi pacienty (převážně pocházejících ze slovanských či středoevropských populací, ve kterých je nabohacena zakladatelská varianta c.657del5). Kontrolní skupina gnomAD, použitá v sekundární analýze má podhodnocené množství jedinců slovanské populace [156]. Navíc je nutné vzít v úvahu, že toto riziko může být ovlivněno fototypem kůže a expozicí UV záření, což jsou významné predispoziční faktory pro vznik melanomu [157].

Hematologické nádory, zejména lymfomy s časným nástupem, jsou běžné u pacientů s NBS. Naše meta-analýza (6 studií; 2 800 pacientů) prokázala střední riziko (OR = 3,42) vzniku hematologických tumorů (u pacientů s leukémií a lymfomem, u dětských i dospělých pacientů, což bylo potvrzeno sekundární analýzou (+2 studie; +285 pacientů) (**Obrázek 9**). Polská studie Tomasik *et al.* zaměřená na dětské pacienty ukázala, že heterozygotní nosiči varianty c.657del5 mají zvýšené riziko recidivující B-buněčné akutní lymfoblastické leukémie [158].

Sekundární analýza, při které jsme jako kontrolní skupinu použili data z databáze gnomAD nám umožnila spočítat rizika vzniku **dalších nádorových onemocnění** (**Obrázek 9**). Výsledky ukázaly, že zárodečné patogenní trunkační varianty v *NBN* nezvyšují riziko ZN endometria a ZN žaludku, mírně zvyšují riziko vzniku ZN kolorekta (OR = 1,64) a hepatocelulárního karcinomu (OR = 2,16) a mají výrazně zvýšené riziko vzniku nádorů mozku (OR = 5,06).



Obrázek 9: Rizika nádorových onemocnění u nosičů patogenních truncačních variant v genech *MRE11*, *RAD50* a *NBN* vyhodnocené v rámci meta-analýzy (černý text a symboly) a v rámci sekundární analýzy (tmavě červený text a symboly).

(A) Srovnání vyhodnocených rizik v rámci meta-analýzy a rizika vyhodnocená pomocí stejných patientských dat a kontrol z databáze gnomAD.

(B) Rizika nádorových onemocnění u nosičů patogenních variant v genech MRN komplexu vyhodnocená z veškerých studií (*case-control*, *case-only*) a kontrolních dat z gnomAD databáze.

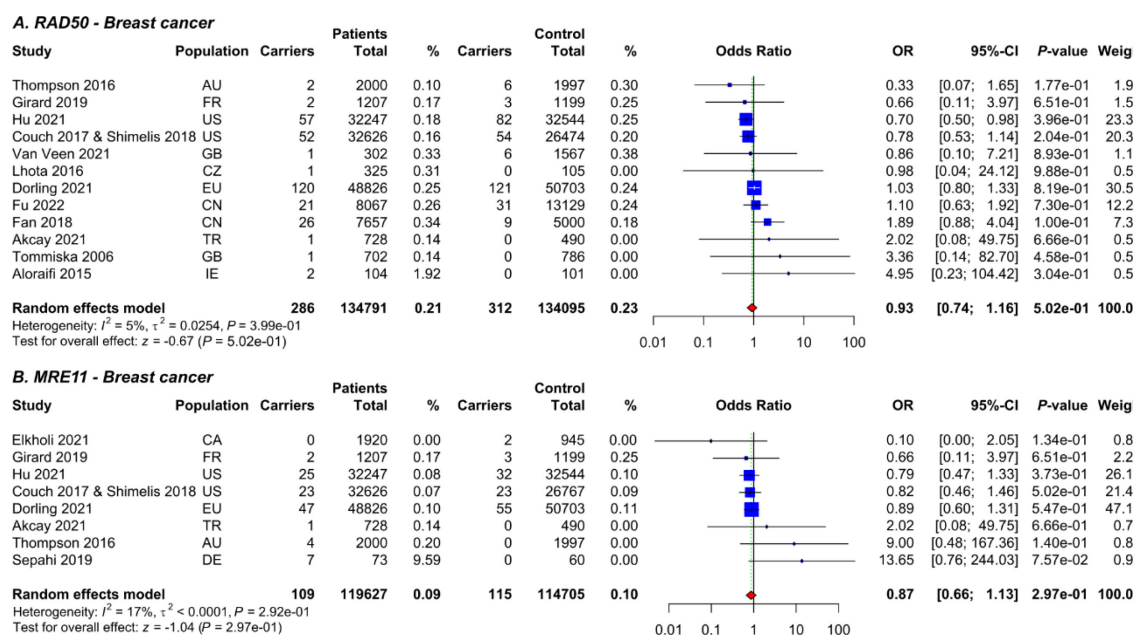
(C) Počet studií a pacientů zahrnutých do každé analýzy (nosiči analyzovaní v meta-analýze a nosiči spolu s kontrolami gnomAD ze sekundární analýzy).

* označuje nádorová onemocnění, která byla vyhodnocena v rámci sekundární analýzy, statisticky významné asociace jsou označeny tučně

Ačkoliv homozygotní NBS pacienti mají zvýšenou četnost výskytu nádorových onemocnění, u pacientů s NBS-like syndromem není tato charakteristika významně pozorována a výskyt heterozygotních nosičů variant v *RAD50* je méně častý (~0,2 % pacientů s nádorovým onemocněním) než nosičů variant v *NBN*. Ani námi provedená meta-analýza neprokázala asociaci se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (13 studií, 13 4791 pacientů) (**Obrázek 10**). Naopak provedená sekundární analýza (+21 studií, +33 247 pacientů) naznačila, že nosičky variant v genu *RAD50* vykazují statisticky významně snížené (!) riziko vzniku karcinomu prsu (OR = 0,68; 95%CI: 0,59–0,78), což je v souladu s meta-analýzou provedenou ve studii Suszynské *et al.*

(OR = 0,51; 95%CI: 0,40–0,64) [118]. Asociace byla potvrzena pouze ve studiích zaměřených na finskou populaci, kde je zvýšená frekvence zakladatelské varianty c.687delT. Zda tento jev odráží hypomorfni povahu varianty c.687delT, zatímco ostatní varianty v genu *RAD50* mají plný patogenní účinek, bude potřeba objasnit v dalších studiích [159].

Nejvýznamněji se vyskytující patogenní zárodečné varianty genu *MRE11* nebyly v meta-analýze spojeny se zvýšeným rizikem karcinomu prsu (9 studií, 119 627 pacientek) (**Obrázek 10**), nicméně sekundární analýza odhalila pouze mírné zvýšení rizika vzniku ZN ovaria (OR = 3,00; 95% CI: 1,27–6,08). Předchozí studie Rebbeck *et al.* našla zvýšené riziko karcinomu ovaria u vybraných haplotypů genu *MRE11* [160].



Obrázek 10: Grafy znázorňující nepřítomnost asociace patogenních truncačních variant v genech (A) *RAD50* a (B) *MRE11* s rizikem vzniku karcinomu prsu.

Výsledky námi provedených analýz by měly poskytnout důležité informace vhodné pro personalizovaný klinický postup u heterozygotních nosičů patogenních variant v genech *MRE11*, *RAD50* a *NBN*. Za zvlášť důležité považujeme důkazy proti asociaci zárodečných variant *NBN* s klinicky významným rizikem vzniku karcinomu prsu u žen, neboť tato závadějící informace bohužel často nadhodnocuje klinickou péči o nosičky c.657del5 varianty v naší populaci.

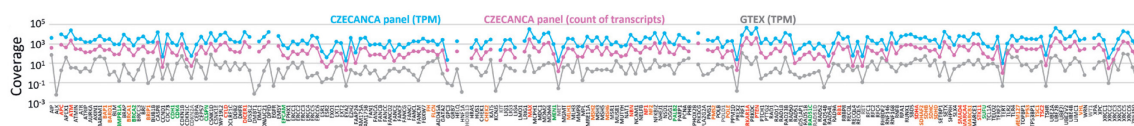
4.2. Optimalizace analýz RNA pro účely diagnostiky nádorové predispozice

4.2.1. Paralelní analýza DNA/RNA jako nástroj pro klasifikaci patogenních variant

Kleiblova P, Cerna M, Zemankova P, Matejkova K, Nehasil P, Hojny J, Horackova K, Janatova M, Soukupova J, [Stastna B](#), Kleibl Z, **Parallel DNA/RNA NGS using identical target enrichment panel in the analysis of hereditary cancer predisposition**, *Folia Biol* 2024; 70: 62-73, (IF₂₀₂₃ = 1,1)

Podíl na studii: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, confirmace nalezených variant, editování manuskriptu

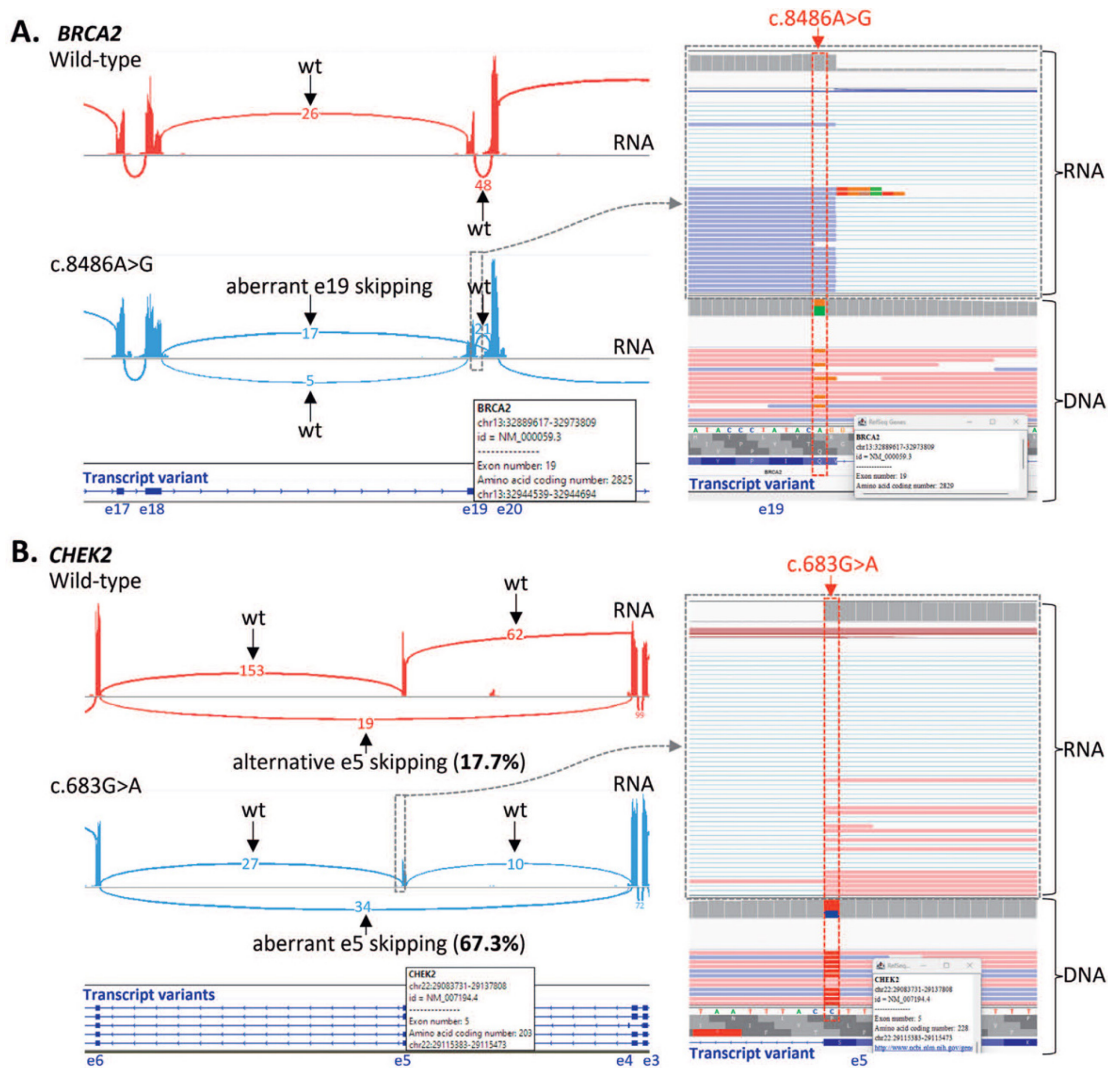
V posledních letech se technologie sekvenování nové generace stala základním analytickým standardem pro diagnostiku predispozice k dědičným nádorovým onemocněním. Jeho stále častější použití klade vysoké nároky na správnou identifikaci vzorku, confirmaci nalezených variant a jejich funkční a zejména klinickou interpretaci. Analýza RNA na úrovni celého transkriptomu nebo sekvenování mRNA je široce používaným přístupem [161]. Pro naše účely analýzy RNA je však klíčové, aby i nízce exprimované geny (včetně *BRCA1*, *BRCA2* a *PALB2*) byly pokryty dostatečným množstvím sekvenačních readů. Bohužel u mnoha tkání je úroveň exprese mnoha mRNA nádorových predispozičních genů velmi nízká a klesá pod hodnotu 1 TPM („*transcript per milion*“), což znemožňuje použití RNA-seq v rutinní diagnostice nebo činí analýzu ekonomicky neúnosnou. Pro zvýšení pokrytí nízce exprimovaných genů zájmu jsme použili přístup cíleného nabohacení pomocí hybridizace v roztoku (*sequence capture*). Abychom analýzy zefektivnili, zavedli jsme paralelní přístup analýzy DNA a RNA s využitím identického panelu (CZECANCA, 226 genů). Analýzy RNA jsme dále také provedli i na vzorcích RNA z různých snadno dostupných tkání (krev, kůže, nosohltan), což nám umožnilo porovnat tkáňově specifické transkripční profily a rozšířit tak možnosti diagnostiky při vyšetření diferenciálně exprimovaných genů. Analýza RNA po cíleném nabohacení pomocí hybridizačních prób panelu CZECANCA nám umožnila spolehlivě vyhodnotit 85,5 % (44/55) klinicky významných nádorových predispozičních genů (**Obrázek 11**).



Obrázek 11: Zvýšení mediánu exprese cílových genů po nabohacení panelem CZECANCA. Absolutní počet unikátních transkriptů (fialová), normalizovaný počet unikátních transkriptů (modrá) ve srovnání s mediánem exprese GTEx v RNA periferní krve (šedá) generované RNA-seq přístupem.

Výhodou paralelní DNA/RNA NGS analýzy je schopnost identifikace alternativních a aberantních sestřihových událostí, tedy ozřejmění funkčního dopadu zachycených variant na zpracování transkriptů v různých tkáních. Na rozdíl od alternativních sestřihů (vznikajících v důsledku výběru sestřihových míst na základě tkáňově specifické exprese sestřihových faktorů, které se váží k *wild-type* DNA) k aberantním sestřihovým událostem dochází v důsledku přítomnosti varianty v DNA. Varianty lokalizované v konsensních sestřihových místech (± 1 , 2) s vysokou pravděpodobností ovlivňují správný sestřih pre-mRNA. Naším přístupem jsme byli schopni popsat aberantní sestřih i u variant mimo kanonická místa. V genu *BRCA2*, který je dle referenční databáze GTEx (Genotype-Tissue Expression; www.gtexportal.org) v krvi exprimovaný pouze velmi málo (0,2 TPM) jsme sekvenováním DNA identifikovali variantu c.8486A>G (p.Q2829R). Paralelní panelové RNA-NGS však prokázalo, že důsledkem popsané transverze v exonu 19 je jeho úplný přeskok a vznik aberantního transkriptu s delecí 52 aminokyselin v oblasti BRC repetice (BRC5 a 6), které se podílejí na opravě DDSB pomocí homologní rekombinace (**Obrázek 12**). Identický aberantní sestřih s jasným funkčním dopadem byl již dříve popsán v některých RNA studiích [162-164]. Příkladem nově detekované varianty s dopadem na aberantní sestřih je varianta c.683G>A v genu *CHEK2* (**Obrázek 12**). Tato varianta byla v ClinVar reportována jako VUS a dosud nebyla na úrovni RNA analyzována. Sekvenováním RNA jsme prokázali, že varianta způsobuje úplný přeskok exonu 5, posun čtecího rámce a předčasnou terminaci translace (p.F199Vfs*6).

Paralelní NGS DNA a RNA umožňuje porovnat a ověřit identifikaci analyzovaných vzorků od jednoho pacienta. Ověření (autentizace) vzorku je založena na hodnocení „*kinship*“ koeficientu, který u správně spárovaných vzorků dosahuje maximální hodnoty 0,5, zatímco nesprávně spárované vzorky vykazují hodnoty významně nižší. Tento robustní přístup eliminuje riziko záměny vzorků a umožňuje nezávislé potvrzení genotypu, což je v diagnostice predispozice k nádorovým onemocněním zásadní a zvyšuje důvěryhodnost vydávaného výsledku.



Obrázek 12: Aberantní sestřihové události v mRNA vzorcích nosičů variant v genech *CHEK2* a *BRCA2*. (A) Varianta c.8486A>G v *BRCA2* lokalizovaná v předposledním nukleotidu exonu 19 vede ke ztrátě sestřihového donorového místa a vede k úplnému přeskoku exonu 19 (r.8332_8487del) a in-frame delecii 52 aminokyselin (p.I2778_Q2829del) (B) Varianta c.683G>A v *CHEK2* lokalizovaná v posledním nukleotidu exonu 5 vede ke ztrátě sestřihového donorového místa a úplnému přeskoku exonu 5 (r.592_683del92), vedoucím k porušení čtecího rámce a předčasné terminaci translace (p.F199Vfs*6). Přeskok exonu 5 je patrný také jako alternativní sestřihová událost, která však nepřesahuje u *wild-type* vzorku 20 %, zatímco u vzorku s heterozygotní variantou c.683G>A je zastoupena v 67,3 %.

Z ekonomického a časového hlediska představuje paralelní analýza DNA/RNA významný inovační přístup. Paralelní příprava sekvenčních knihoven a následné sekvenování vzorků výrazně redukuje finanční náklady a dobu potřebnou k dosažení výsledků. Díky nabohacení transkriptů jsme schopni oproti klasickým RNA-seq metodám vyhodnotit s vyšší citlivostí i varianty v nízkce exprimovaných genech.

4.2.2. Automatizace izolace RNA

Cerna M*, [Stastna B*](#), Pesek P, Dolezalova T, Janatova M, Soukupova J, Horackova K, Kleiblova P, **Semi-automated RNA isolation from Tempus Blood RNA tubes using the MagCore Plus II instrument**, *Folia Biol* 2025, (IF₂₀₂₃=1,1)

* sdílené první autorství

Podíl na studii: literární rešerše, izolace RNA, statistická analýza a vyhodnocení, příprava a finální úprava rukopisu.

Izolace RNA představuje klíčový krok pro přípravu NGS sekvenačních knihoven. Ve srovnání s DNA, jsou RNA molekuly náchylné k degradaci [165, 166]. Aby byla zachována plná integrita RNA, přidávají se do odběrových zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (Qiagen) a Tempus Blood RNA Tubes (Thermo Fisher Scientific) různá ochranná media, která zjednodušují manipulaci s krevními vzorky a eliminují nutnost přepravy zkumavek na suchém ledu [167-169]. Manuální izolace RNA zahrnuje řadu kroků, které jsou časově náročné, vyžadují značné pracovní úsilí a zvyšují riziko kontaminace nebo záměny vzorků. Automatické izolace RNA umožňují jednoduchou manipulaci se vzorky, zrychlují vyšetření a minimalizují riziko kontaminace nebo špatné identifikace jednotlivých vzorků.

Abychom izolaci RNA v naší laboratoři zefektivnili, popsali jsme novou možnost semi-automatické izolace celkové RNA z periferní krve (odebrané do zkumavek Tempus obsahující médium pro prezervaci RNA) do jednotlivých 1,5 ml zkumavek na přístroji MagCore Plus II, který se rutinně používá v mnoha laboratořích pro izolaci RNA z čerstvé krve a zejména pro izolaci DNA.

RNA byla izolována pomocí kitu MagCore triXact RNA (#631, určen originálně pro izolaci z neprezervované plné krve) s upraveným protokolem (#631T) v izolátoru MagCore Plus II. Upravený protokol #631T byl optimalizován pro izolaci z Tempus zkumavek vynecháním lyzačního kroku.

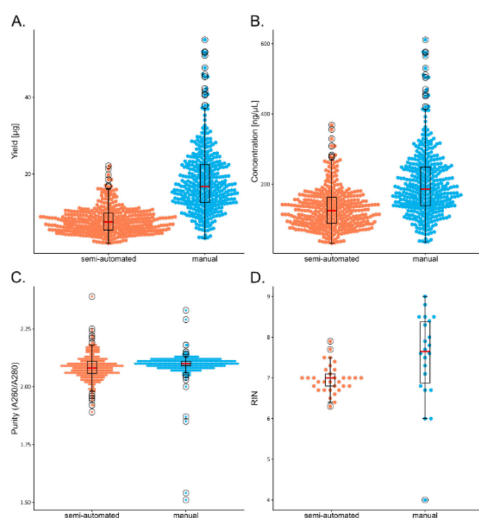
V rámci protokolu jsme optimalizovali dvě izolace RNA z 9, 6 a 3 ml lyzátu krve v Tempus zkumavkách. Výsledky ukázaly, že ve srovnání s manuální izolací RNA z celých 9 ml je izolace z 6 ml Tempus krevního lyzátu optimální variantou, neboť výsledná RNA měla adekvátní koncentraci, výtěžek, čistotu i integritu vhodnou pro použití v NGS. Zbývající 3 ml krevního lyzátu lze archivovat pro použití v případě selhání původní izolace (**Tabulka 5**).

Tabulka 5: Porovnání kvantitativních a kvalitativních parametrů semi-automatické izolace RNA z různých objemů Tempus krevního lyzátu (eluce do 60 µl elučního pufru)

Tempus lyzát krve [ml]	1×PBS [ml]	Počet vzorků (N=)	RNA výtěžek [µg]	RNA koncentrace [ng/µl]	RNA čistota (OD _{260/280})	RIN
9	3	8	7,6 ± 2,8	126,5 ± 46,2	2,1 ± 0,01	7,4 ± 0,3
6	6	8	9,3 ± 2,2	154,7 ± 37,0	2,1 ± 0,03	7,5 ± 0,4
3	3	8	4,0 ± 0,9	67,4 ± 14,4	2,2 ± 0,06	6,9 ± 0,8

Důležitou výhodou semi-automatického postupu je výrazná redukce času ruční práce. Manuální izolace 16 vzorků trvala v průměru 185 minut, z čehož 125 minut zahrnovala přímá manipulace se vzorkem a materiálem. Naproti tomu automatická izolace s využitím přístroje MagCore Plus II vyžaduje celkem 150 minut, přičemž samotná přímá práce se vzorkem vychází na pouhých 45 minut, čímž se zvyšuje rychlost analýz a snižuje riziko kontaminace či chyb v identifikaci vzorků.

Při srovnání výsledků manuální izolace a semi-automatické izolace se ukázalo, že manuální izolace (z 9 ml lyzátu) poskytuje mírně vyšší hodnoty koncentrace a integrity RNA, nicméně všechny vzorky izolované semi-automatickou metodou (z 6 ml lyzátu) jsou vhodným vstupním materiálem pro cílené RNA NGS v rámci testování nádorové predispozice (**Obrázek 13**). Nižší výtěžnost semi-automatické izolace není překážkou pro použití v diagnostice, neboť klíčovým parametrem je konzistentní kvalita a integrita RNA a standardizace izolačního postupu.



Obrázek 13: (A) Výtěžek, (B) koncentrace, (C) čistota, and (D) RIN* izolovaných RNA 760 pacientů – 380 bylo izolováno semi-automatickou metodou na přístroji MagCore Plus II (z 6 ml Tempus krevního lyzátu; eluční objem 60 µl; oranžově) and 380 bylo izolováno manuálně kitem Tempus Spin Kit (z 9 ml of Tempus krevního lyzátu; eluční objem 90 µl; modře). *RIN byl vyhodnocen pouze u 33 a 22 vzorků izolovaných semi-automaticky a a 22 vzorků izolovaných manuálně.

Z pohledu praktického použití má zavedení semi-automatického postupu zásadní význam, kdy automatizace umožňuje snadnější a rychlejší provádění izolací v laboratoři, což je v souvislosti s rostoucím počtem vyšetřovaných pacientů nespornou výhodou.

4.2.3. Využití sekvenování RNA pro charakterizaci rekurentní zakladatelské patogenní varianty v genu *CHEK2*

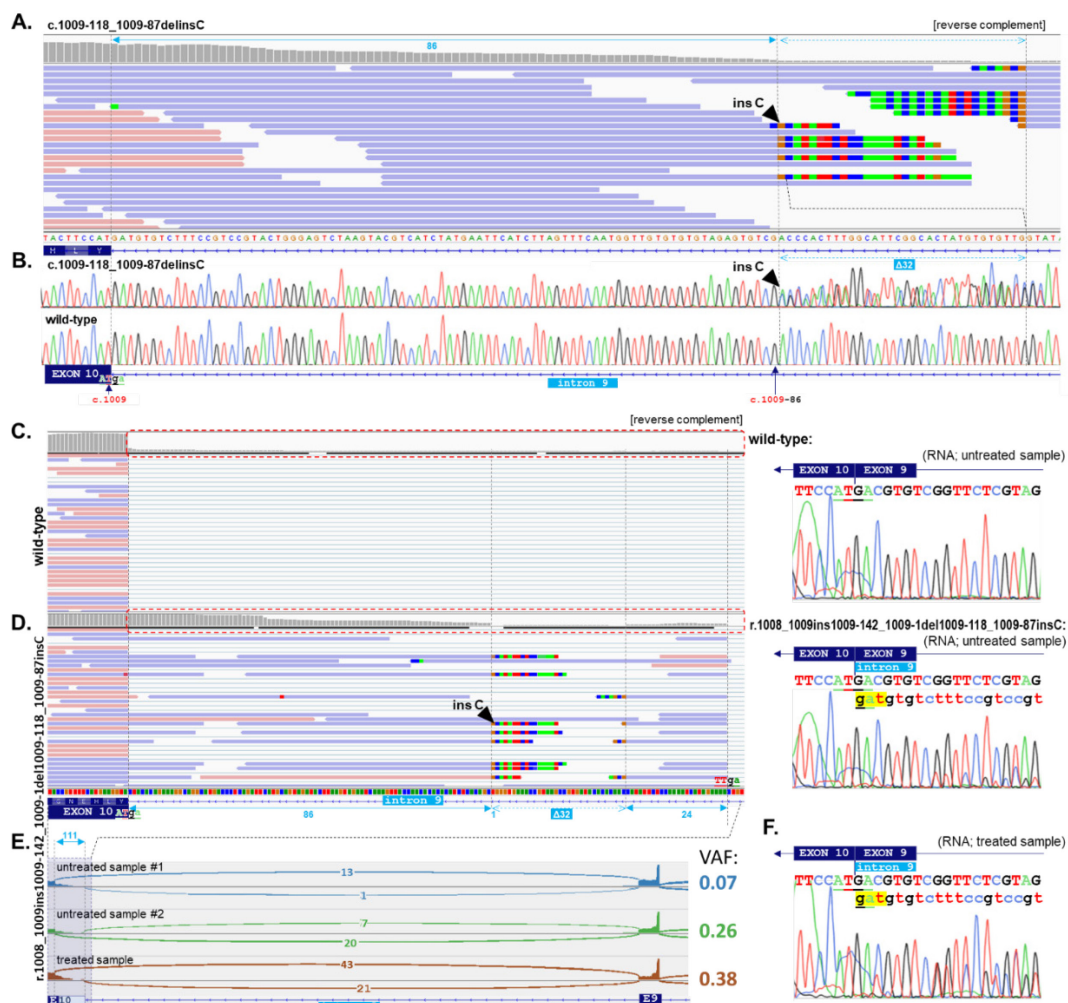
Zemankova P, Cerna M, Horackova K, Ernst C, Soukupova J, Borecka M, Blümcke B, Cerna L, Cerna M, Curtisova V, Dolezalova T, Duskova P, Dvorakova L, Foretova L, Havranek O, Hauke J, Hahnen E, Hodulova M, Hovhannisyan M, Hruskova L, Janatova M, Janikova M, Jelinkova S, Just P, Kosarova M, Koudova M, Krutikova V, Machackova E, Matejkova K, Michalovska R, Misove A, Nehasil P, Nemcova B, Novotny J, Panczak A, Pesek P, Scheinost O, Springer D, **Stastna B**, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Tureckova E, Vesela K, Vlckova Z, Vocka M, Wappenschmidt B, Zima T, Kleibl Z, Kleiblova P, **A deep intronic recurrent CHEK2 variant c.1009-118_1009-87delinsC affects pre-mRNA splicing and contributes to hereditary breast cancer predisposition**, *Breast*, 2024 Mar 25;75:103721, doi: 10.1016/j.breast.2024.103721 (IF₂₀₂₃=5,7)

Podíl na studii: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, confirmace nalezených variant, editování manuskriptu

Gen *CHEK2* (*checkpoint kinase 2*) kóduje jadernou serin/threoninovou proteinkinázu CHK2 [170]. Heterozygotní zárodečné patogenní varianty genu *CHEK2* způsobují středně zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu (OR ~2.5) [15, 16] a zvyšují riziko vzniku dalších nádorových onemocnění, včetně ZN štítné žlázy, slinivky, ledvin nebo hematologických nádorů [22, 171-175]. Homozygotní nosiči nebo složení heterozygoti patogenních variant *CHEK2* mají ve srovnání s heterozygoty podstatně vyšší riziko vzniku nádorových onemocnění a nádory se u nich vyvíjejí v mladším věku [176, 177].

CHEK2 je v naší populaci třetím nejčastěji alterovaným nádorovým predispozičním genem po *BRCA2* a *BRCA1* [13]. Četnost zachytu patogenních truncačních zárodečných variant v *CHEK2* je přibližně 1,1–1,3 % u neselektovaných pacientek s karcinomem prsu z Evropy a USA [15, 16], přičemž dalších 0,5 % pacientů s karcinomem prsu mohou být nosičky vzácných patogenních missense variant [13].

V rámci optimalizace RNA analýz popsaných v kapitole 4.2.1. jsme v genu *CHEK2* identifikovali hlubokou intronovou variantu c.1009-118_1009-87delinsC, která vede k využití sestřihového akceptorového místa v pozici c.1009-142 a retenci terminální části intronu 9 přiléhajícího k exonu 10. Analýza RNA na vzorcích kultivovaných leukocytů periferní krve ukázala, že varianta způsobuje posun čtecího rámce a zařazení terminačního kodonu, který vede k předčasné terminaci translace (r.1008_1009ins1009-142_1009-1del1009-118_1009-87insC). Kvantitativní analýza poměru aberantního a plně funkčního transkriptu ukázala, že vznikající mRNA je z velké části degradovaná procesem NMD (*nonsense-mediated decay*; **Obrázek 14**).



Obrázek 14: Analýza varianty c.1009-118_1009-87delinsC v genu *CHEK2* a její dopad na sestřih pre-mRNA. Varianta na úrovni DNA detekovaná pomocí NGS analýzy (A) a Sangerova sekvenování (B). Šedé svislé přerušované čáry vyznačují hranice delece, černou šipkou je označena inserce C. Vlevo (C–D) je vizualizace RNA analýzy pomocí NGS u *wild-type* kontroly (nahore) a vzorku s testovanou variantou (dole), u kterého můžeme pozorovat téměř poloviční zastoupení aberantně zpracovaných transkriptů. Vpravo je porovnání Sangerova sekvenování na úrovni RNA/cDNA u vzorku bez mutace (C) a vzorku s testovanou variantou bez (D) a s (F) inhibicí nonsense-mediated decay (NMD) pomocí cykloheximidu ve finální koncentraci 200 µg/ml po dobu 4 hodin. Vlevo (E) je vizualizace RNA analýzy pomocí NGS u vzorků s/bez ovlivnění NMD.

Popsaná hluboká intronová varianta byla identifikována u 21/10 204 (0,21 %) českých pacientek s karcinomem prsu a pouze 1/3 250 (0,03 %) populačně specifických kontrol (OR = 6,7; 95%CI: 1,08–276,88, $p = 0,04$). Přítomnost varianty byla popsána u 4/3 639 německých pacientek s karcinomem prsu, které byly zařazeny do studie ve spolupráci s německým HBOC konsorciem. Prevalence výskytu této varianty odpovídá výskytu rekurentní zakladatelské slovanské varianty c.444+1G>C a sestřihové varianty c.846+4_846+7del. Všechny tyto informace vedly ke klasifikaci varianty c.1009-118_1009-87delinsC jako pravděpodobně patogenní.

4.3. Klasifikace variant pomocí funkčních analýz *in vitro*

4.3.1. Funkční analýza variant nejasného významu genu *FANCG* nalezených u pacientek s karcinomem prsu a ovarii

Soukupova J*, [Stastna B*](#), Kanwal M, Hojny J, Zemankova P, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Cerna M, Curtisova V, Dolezalova T, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Hruskova L, Chvojka S, Janatova M, Janikova M, Jelinkova S, Just P, Kalousova M, Kleiblova P, Kosarova M, Koudova M, Kral J, Krausova M, Krutilkova V, Machackova E, Matejkova K, Michalovska R, Nehasil P, Nemcova B, Novotny J, Palek M, Pesek P, Safarikova M, Scheinost O, Springer D, Stolarova L, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Tureckova E, Vesela K, Vlckova Z, Vocka M, Zima T, Macurek L, Kleibl Z; CZEKANCA consortium, **A comprehensive study evaluating germline *FANCG* variants in predisposition to breast and ovarian cancer**, *Cancer Med*, 2024 Aug;13(16):e70103, 4. (IF₂₀₂₃=2,9)

* sdílené první autorství

Podíl na studii: příprava sekvenačních knihoven a provedení NGS, confirmace nalezených variant, příprava plazmidů a stabilních linií, funkční charakterizace missense variant *in vitro*, příprava manuskriptu

Geny Fanconiho anemie (FA) kódují komplex více než 20 proteinů zapojených do reparace poškození DNA vzniklé mezireťezcovým kovalentním spojením komplementárních vláken DNA [67]. Některé geny FA patří mezi důležité predispoziční geny karcinomu prsu a/nebo ovaria s jasným klinickým významem včetně *BRCA1 (FANCS)* a *BRCA2 (FANCD1)*, ale také *PALB2 (FANCN)*, *BRIPI (FANCI)* a *RAD51C (FANCO)*. Nicméně význam variant ve zbylých 17 FA genech v asociaci s rizikem karcinomu prsu a/nebo ovaria je stále nejasný [178, 179].

Zárodečné bialelické varianty v genech *FANCG*, *FANCA* a *FANCC* patří k nejčastěji alterovaným genům u přibližně 80 % pacientů s FA [180]. Heterozygotní patogenní varianty v těchto genech nejsou popisovány tak často a jejich asociace s rizikem vzniku nádorových onemocnění zůstává nejasná [69]. Varianty v genu *FANCG* byly pozorovány u pacientů s karcinomem prsu [181, 182], ovaria [70], a slinivky břišní [71, 72, 183].

V naší předchozí studii jsme popsali zárodečné patogenní varianty ve *FANCG* u pěti pacientek s karcinomem ovaria [19], což naznačovalo možnou asociaci variant v genu *FANCG* se zvýšeným rizikem tohoto onemocnění. Pro lepší pochopení významu dědičných variant v genu *FANCG* jsme provedli *case-control* analýzu u pacientek s karcinomem prsu a karcinomem ovaria a funkční analýzu vybraných variant nejasného významu *in vitro*.

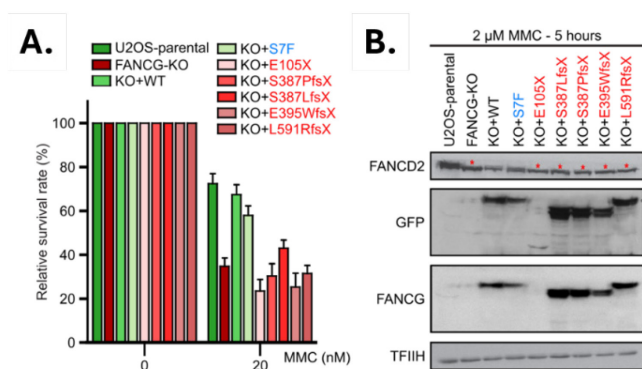
Genetické testování bylo provedeno u 10 204 českých pacientek s karcinomem prsu a 2 966 neselektovaných pacientek s karcinomem ovaria v rámci konsorcia CZEKANCA. Celkem jsme

nalezli 57 vzácných heterozygotních zárodečných variant, nicméně jejich frekvence se nelišila mezi kontrolami (6/3 250; 0,18 %) a pacientkami s karcinomem prsu (20/10 204; 0,20 %; OR = 1,1; 95%CI: 0,4 – 2,7; $p = 0,9$) ani mezi kontrolami a pacientkami s karcinomem ovaria (8/2 966; 0,27 %; OR = 1,5; 95%CI: 0,5 – 4,2; $p = 0,5$) (**Tabulka 6**). Tento výsledek je v souladu s poslední publikovanou studií Song *et al.* [70], která také nenalezla asociaci genu *FANCG* se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria (OR = 1,4; 95%CI: 0,5 – 3,4).

Na pěti dostupných vzorcích tumorů byla provedena analýza ztráty heterozygosity *wild-type* alely *FANCG*, která je typickou známkou příčinných alterací tumorsupresorových genů. Ztráta WT alely byla ale pozorována pouze u jednoho vzorku od pacientky s nádorem prsu a variantou c.313G>T (p.Glu105Ter). Tento výsledek zapadá do obrazu výše uvedených pozorování a potvrzuje, že gen *FANCG* není pravděpodobně klinicky podstatným genem pro patogenezi studovaných nádorových onemocnění.

V rámci studia predispozice dědičných variant *FANCG* jsme u vybraných vzácných missense variant (nabohacených u pacientek ve srovnání s kontrolami), provedli funkční *in vitro* analýzy. Pro devět vybraných vzácných missense variant, tři frekventní missense varianty (negativní kontroly) a pět patogenních trunkačních variant (pozitivní, katalyticky nefunkční kontroly) byly vytvořeny stabilní linie s inaktivací endogenního *wild-type* *FANCG* pomocí CRISPR/Cas9 U2OS-FANCG-KO exprimující následně studované variantní izoformy FANCG proteinu.

U všech trunkačních variant (pozitivních kontrol) byla pozorována snížená schopnost proliferace v přítomnosti genotoxického činidla mitomycinu C (**Obrázek 15**) a snížená schopnost variantních FANCG ubikvitinylovat protein FANCD2 po působení mitomycinu C (**Obrázek 15**). Tento výsledek ukázal, že patogenní varianty snižují schopnost proliferace buněk a monoubikvitinylace FANCD2, nicméně jejich četnost je u pacientů a kontrol téměř shodná.



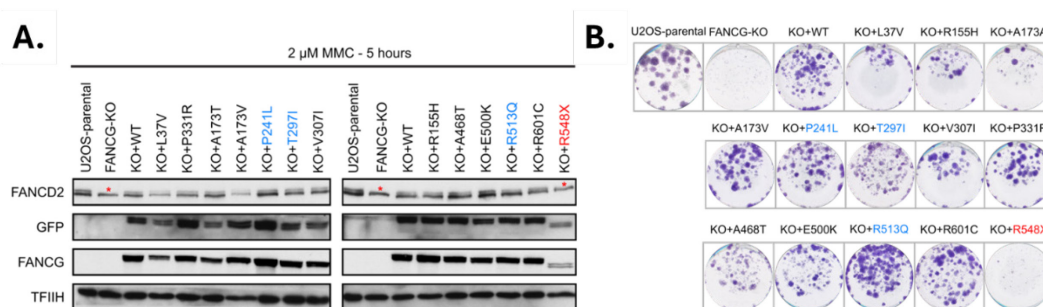
Obrázek 15:

(A) Schopnost proliferace stabilních buněčných linií exprimujících FANCG s patogenními variantami v reakci na mitomycin C.

(B) Schopnost monoubikvitinylace FANCD2 variantními proteiny FANCG. Detekce specifického signálu monoubikvitinylovaného FANCD2 vyhodnocena pomocí western blotu (horní pomalu migrující band).

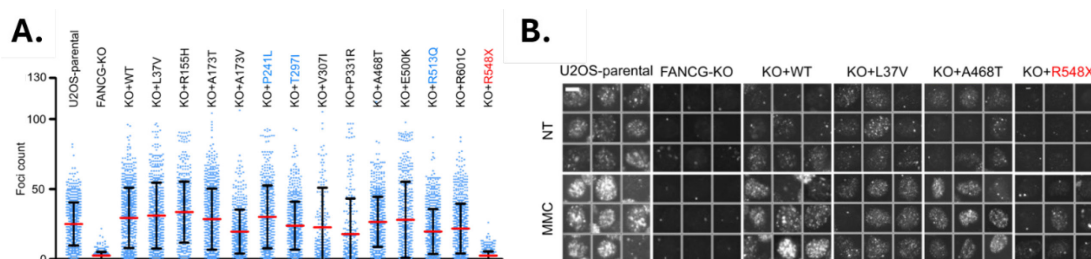
Aktivita variantních FANCG v buňkách exprimujících *FANCG* s vybranými missense variantami byla nejprve hodnocena po působení mitomycinu C pomocí detekce specifického signálu monoubikvitinylovaného FANCD2 na western blotu (**Obrázek 16**). Následně jsme

hodnotili míru proliferace a schopnost buněk tvořit kolonie v mediu s genotoxickým činidlem mitomycinem (**Obrázek 16**).



Obrázek 16: Schopnost U2OS-FANCG-KO buněk exprimujících missense varianty FANCG a patogenní truncační variantu p.R548X (**A**) monoubikvitinylovat FANCD2 po působení mitomycinu C (horní pomalu migrující band) a (**B**) tvořit po dobu 7 dní kolonie v mediu s mitomycinem C.

Třetí analýzou byla imunofluorescenční kvantitativní analýza lokalizace FANCD2 v jaderných ohniscích v buňkách exprimujících FANCG s vybranými variantami po působení mitomycinu C (**Obrázek 17**) pomocí fluorescenční mikroskopie na přístroji ScanR.



Obrázek 17: (**A**) Kvantitativní analýza lokalizace FANCD2 v jaderných ohniscích po působení mitomycinu C ve srovnání s patogenní truncační variantou p.R548X (**B**) reprezentativní obrázek z fluorescenční mikroskopie. Imunofluorescenčně barvený FANCD2 v jaderných ohniscích je po působení mitomycinu C v jádrech buněk exprimujících missense varianty FANCG dobře viditelný ve srovnání s patogenní truncační variantou p.R548X (měřítko 10 μm).

Ve všech stabilních buněčných liniích U2OS-FANCG-KO exprimujících missense varianty FANCG, byla pozorována plná kapacita DNA reparační aktivity FANCG. Tyto výsledky spolu s výsledky *case-control* analýz ukazují, že heterozygotní varianty genu FANCG (včetně patogenních truncačních variant) nezpůsobují zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu a ovaria.

Tabulka 6: Nalezené missense varianty nejasného významu v genu *FANCG*.

exon	TPR	Varianta (NM 004629.2)		ClinVar		InterVar	ZN prsu (N=10,204)	ZN ovaria (N=2,966)	CTRLs (N=3,250)
(i)	#	c.	p.	variant ID	status	class	N (%)	N (%)	N (%)
VZÁCNÉ MISSENSE varianty									
2		109C>G	Leu37Val ^(†)	1319087	3*---	LB	4 (0.04)	-	
2		122A>G	Gln41Arg	n.a.	n.a.	LB	2 (0.02)	-	1 (0.03)
4		338G>A	Arg113Lys	526405	3*---	LB		-	3 (0.09)
4		401A>C	Glu134Ala	n.a.	n.a.	VUS	1 (0.01)	-	-
4		418C>T	His140Tyr	n.a.	n.a.	VUS	1 (0.01)	-	-
4		421C>T	Arg141Cys	239967	3*---	VUS		1 (0.03)	-
4		422G>A	Arg141His	999134	3*---	LB	2 (0.02)	-	-
4		464G>A	Arg155His ^(†)	456236	3*---	LB	2 (0.02)	2 (0.07)	-
4		486A>T	Leu162Phe	1416142	3*---	LB	1 (0.01)	-	1 (0.03)
5		517G>A	Ala173Thr ^(†)	2085419	3*---	LB	1 (0.01)	-	2 (0.06)
5		518C>T	Ala173Val ^(†)	n.a.	n.a.	VUS	-	-	3 (0.09)
5		580C>G	Pro194Ala	n.a.	n.a.	VUS	1 (0.01)	-	-
6		724C>T	Arg242Trp	912780	3*---	VUS	-	-	1 (0.03)
6	1	761C>T	Ser254Phe	1319083	3*---	VUS	2 (0.02)	-	1 (0.03)
7	1	794C>T	Ala265Val	912779	3*---	VUS	-	-	1 (0.03)
7	1	835T>G	Trp279Gly	1336044	3*---	VUS	1 (0.01)	1 (0.03)	-
7		910G>C	Glu304Gln	2577889	3*---	VUS	1 (0.01)	-	-
7		917T>C	Leu306Pro	2202538	3*---	VUS	1 (0.01)	-	-
7		919G>A	Val307Ile ^(†)	n.a.	n.a.	VUS	3 (0.03)	-	-
8		956C>T	Pro319Leu	n.a.	n.a.	LB	1 (0.01)	-	2 (0.06)
8		992C>T	Pro331Leu	n.a.	n.a.	LB	1 (0.01)	-	-
8		992C>G	Pro331Arg ^(†)	802483	3*---	LB	6 (0.06)	-	3 (0.09)
8		1027C>G	Gln343Glu	914731	3*---	VUS	1 (0.01)	-	-
8	2	1070C>T	Thr357Met	1806248	3*---	LB	2 (0.02)	-	-
8	2	1076G>A	Arg359Lys	1199306	3*---	VUS	2 (0.02)	-	-
9		1143G>C	Arg381Ser	n.a.	n.a.	VUS	1 (0.01)	-	1 (0.03)
10		1157C>A	Pro386His	914728	3*---	LB	-	2 (0.07)	-
10		1268G>A	Arg423His	456228	3*---	VUS	2 (0.02)	2 (0.07)	-
10		1298G>A	Arg433Gln	644471	3*---	LB	-	1 (0.03)	-
10		1328A>G	Lys443Arg	n.a.	n.a.	LB	1 (0.01)	-	-
10	3	1367A>T	His456Leu	579904	3*---	VUS	2 (0.02)	1 (0.03)	-
10	3	1402G>A	Ala468Thr ^(†)	n.a.	n.a.	VUS	1 (0.01)	1 (0.03)	1 (0.03)
12		1492A>C	Asn498His	836334	3*---	LB	-	1 (0.03)	-
12		1498G>A	Glu500Lys ^(†)	2056153	3*---	VUS	5 (0.05)	-	2 (0.06)
12		1505G>T	Gly502Val	1721737	3*---	VUS	2 (0.02)	-	-
12	4	1546G>A	Ala516Thr	2043453	3*---	VUS	2 (0.02)	-	-
12	4	1558C>T	Arg520Cys	n.a.	n.a.	VUS	-	1 (0.03)	-
12	4	1586A>G	Gln529Arg	2038189	3*---	VUS	1 (0.01)	-	-
13		1643G>A	Arg548Gln	1692835	3*---	LB	1 (0.01)	1 (0.03)	-
13		1685A>G	Asp562Gly	n.a.	n.a.	VUS	-	1 (0.03)	-
13		1688G>A	Arg563Gln	846051	3*---	VUS	1 (0.01)	-	-
13		1754C>G	Ala585Gly	n.a.	n.a.	VUS	1 (0.01)	-	-
14		1801C>T	Arg601Cys ^(†)	666016	3*---	VUS	3 (0.03)	1 (0.03)	-
14		1802G>A	Arg601His	n.a.	n.a.	LB	-	-	2 (0.06)
Všechny vzácné missense varianty							59 (0.58)	16 (0.54)	24 (0.74)
FREKVENTNÍ MISSENSE varianty									
1		20C>T	Ser7Phe ^(†)	134358	1/2/3*---	LB	30 (0.30)	9 (0.30)	12 (0.37)
6		722C>T	Pro241Leu ^(†)	221037	2/3*---	VUS	10 (0.10)	-	1 (0.03)
7		890C>T	Thr297Ile ^(†)	134367	1/2*---	LB	27 (0.26)	8 (0.27)	9 (0.27)
12		1538G>A	Arg513Gln ^(†)	134361	1/2/3*---	LB	112 (1.10)	41 (1.38)	42 (1.29)
Všechny frekventní missense varianty							179 (1.75)	58 (1.96)	64 (1.97)

Legenda: (i) – intron; c. – cDNA; p. – protein; TPR – tetratricopeptide repeat (čísla 1 – 4); ^(†) – analyzované varianty ve funkční esejí; ^{FA} – variant nalezené u pacientů s FA, n.a. – nedostupné; P – patogenní; VUS – varianta nejasného významu; LB – pravděpodobně benigní. InterVar (<https://wintervar.wglab.org/>). ClinVar status 2023/12/01.

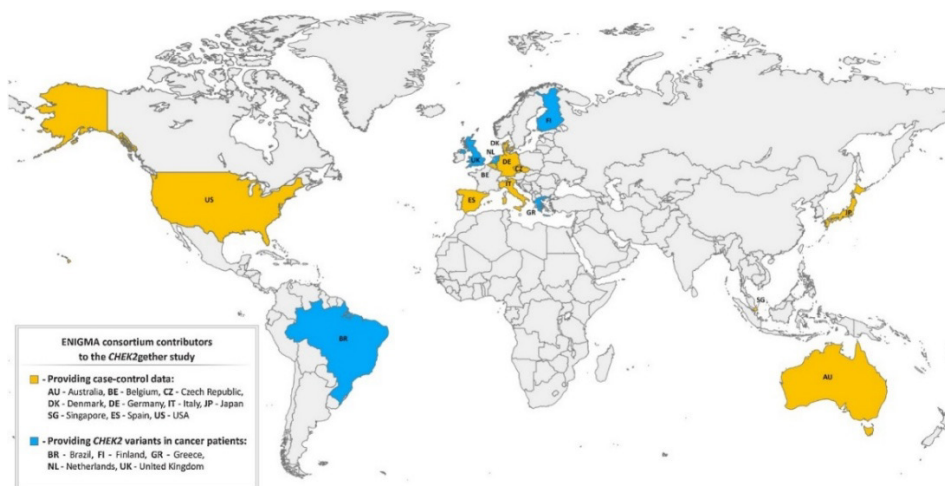
4.3.2. Funkční analýza zárodečných missense variant *CHEK2* asociovaných se zvýšeným rizikem karcinomu prsu

Stolarova L, Kleiblova P, Zemankova P, [Stastna B](#), Janatova M, Soukupova J, Achatz MI, Ambrosone C, Apostolou P, Arun BK, Auer P, Barnard M, Bertelsen B; Biobank Japan; Blok MJ, Boddicker N, Brunet J, Burnside ES, Calvello M, Campbell I, Chan SH, Chen F, Chiang JB, Coppa A, Cortesi L, Crujeiras-González A; Consortium CZECANCA; De Leeneer K, De Putter R, DePersia A, Devereux L, Domchek S, Efremidis A, Engel C, Ernst C, Evans DGR, Feliubadaló L, Fostira F, Fuentes-Ríos O, Gómez-García EB, González S, Haiman C, Hansen TVO, Hauke J, Hodge J, Hu C, Huang H, Ishak NDB, Iwasaki Y, Konstantopoulou I, Kraft P, Lacey J, Lázaro C, Li N, Lim WK, Lindstrom S, Lori A, Martinez E, Martins A, Matsuda K, Matullo G, McInerney S, Michailidou K, Montagna M, Monteiro ANA, Mori L, Nathanson K, Neuhausen SL, Nevanlinna H, Olson JE, Palmer J, Pasini B, Patel A, Piane M, Poppe B, Radice P, Renieri A, Resta N, Richardson ME, Rosseel T, Ruddy KJ, Santamariña M, Dos Santos ES, Teras L, Toland AE, Trentham-Dietz A, Vachon CM, Volk AE, Weber-Lassalle N, Weitzel JN, Wiesmuller L, Winham S, Yadav S, Yannoukakos D, Yao S, Zampiga V, Zethoven M, Zhang ZW, Zima T, Spurdle AB, Vega A, Rossing M, Del Valle J, De Nicolo A, Hahnen E, Claes KBM, Ngeow J, Momozawa Y, James PA, Couch FJ, Macurek L, Kleibl Z, **ENIGMA CHEK2gether project: a comprehensive study identifies functionally-impaired CHEK2 germline missense variants associated with increased breast cancer risk**, *Clin Cancer Res*, 2023 Aug 15;29(16):3037-3050, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-23-0212, (IF₂₀₂₃=10,0)

Podíl na studii: podíl na vyhodnocení výsledků funkčních analýz testovaných variant, statistická analýza, editování manuskriptu

Vzhledem ke zvýšenému riziku karcinomu prsu se analýza variant genu *CHEK2* stala rutinní součástí genetického testování [184]. Ačkoliv truncační varianty nebo varianty způsobující aberantní sestřih pre-mRNA *CHEK2* jsou považovány za jasně patogenní, naprostá většina detekovaných variant jsou missense varianty nejasného významu (VUS). Riziko vzniku karcinomu prsu se v asociaci se zárodečnými missense variantami může od truncačních variant lišit [185-187].

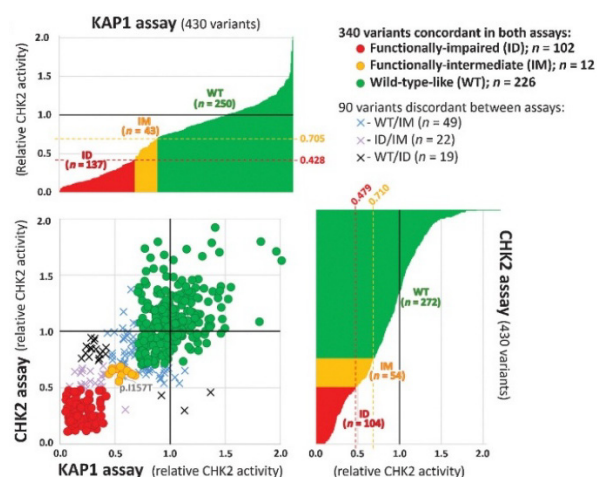
Abychom lépe porozuměli klinickému významu *CHEK2* VUS, shromáždili jsme v rámci mezinárodního konsorcia ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles) missense varianty identifikované při analýzách nádorové predispozice, které jsme následně testovali pomocí funkčních analýz *in vitro* [188, 189]. Následně jsme od členů konsorcia ENIGMA shromáždili 12 souborů dat týkajících se pacientů a kontrol, které zahrnovaly celkem 161 706 pacientek s karcinomem prsu a populačně specifických kontrol z 10 zemí, a analyzovali jsme riziko vzniku karcinomu prsu u nosiček funkčně stratifikovaných missense variant *CHEK2* (**Obrázek 18**) .



Obrázek 18: Geografický původ analyzovaných missense variant genu *CHEK2*.

V rámci mezinárodní spolupráce jsme shromáždili 460 *CHEK2* missense VUS reportovaných konsorciem ENIGMA. Jejich funkční charakterizace byla provedena pomocí kvantifikace fosforylace KAP1-S473 a autofosforylace CHK2-S516 v lidských RPE1-*CHEK2*-KO buňkách (dle metody vyvinuté MUDr. Liborem Macůrkem, Ph.D. z ÚMG AV ČR). Hodnoceny byly níže transfekované buňky, aby byl hodnocený stav co možná nejpodobnější fyziologické situaci. Míra enzymatické aktivity v obou esejích je stanovena jako průměr poměrů fosforylovaného substrátu (KAP1 a CHK2) vůči celkovému množství enzymu normalizovaného vůči aktivitě *wild-type* CHK2.

Shodné výsledky obou funkčních testů byly použity ke kategorizaci *CHEK2* VUS z 12 souborů dat ENIGMA zahrnujících 73 048 pacientek s karcinomem prsu a 88 658 populačně specifických kontrol. Celkem bylo úspěšně analyzováno 430/460 missense variant, z nichž interpretace 340 (79,1 %) variant byla shodná v obou funkčních testech. Jako katalyticky nefunkční bylo kategorizováno 102 variant, jako funkčně intermediární 12 variant a jako wt-like 226 variant (**Obrázek 19**).



Obrázek 19: Výsledky funkčních analýz variant v genu *CHEK2* za využití KAP1-pS473 a CHK2-pS516 esejí. Varianty jsou dle relativní enzymatické aktivity kategorizovány jako wt-like, intermediární a katalyticky nefunkční (ID).

Abychom propojili tyto funkční charakteristiky s rizikem vzniku karcinomu prsu, provedli jsme *case-control* analýzu a vyhodnotili riziko vzniku karcinomu prsu v jednotlivých funkčních skupinách (**Obrázek 20**). Pro nosičky wt-like missense variant bylo stanoveno riziko vzniku karcinomu prsu 1,19 (95%CI: 1,08 – 1,31; $p=0,004$), pro nosičky funkčně intermediárních variant 1,57 (95%CI: 1,41 – 1,75; $p<0,0001$) a pro nosičky katalyticky nefunkčních variant 2,83 (95%CI: 2,35 – 3,41; $p<0,0001$).

F-ctional class	Position c.	Position p.	All	73048 Pre	88658 Ctrl	AU 6740	BE 14711	CZ 2248	DE 8222	DK 4832	ES1 1662	ES2 6838	IT 2767	JP 2582	SG-CN 1348	SG-O 2454	US 1675	OR (95%CI); P value															
All wild-type (WT; 184 variants)			1746	863	883	79	103	18	61	42	9	94	24	35	14	28	18	13	25	55	20	110	146	18	65	5	16	366	382	3247	2544	1.19 (1.08-1.31); 3.6E-4	
WT	14C>T	Ser5Leu	21	6	15	4	8					1	1															1	6			0.44 (0.14-1.19); 0.08	
WT	254C>G	Pro85Arg	157	55	102							1																	54	102		0.49 (0.34-0.68); 1.3E-5	
WT	254C>T	Pro85Leu	48	12	36	1	6		18	2		4	1				1			1	6	3	5									0.39 (0.19-0.77); 3.5E-3	
WT	410G>A	Arg137Gln	58	41	17	9	1		3	2		7											7	4								2.58 (1.43-4.84); 8.5E-4	
WT	538C>T	Arg180Cys	249	128	121	8	10	1	3	8	1	15	9	10	11										18	31						1.20 (0.93-1.55); 0.16	
WT	539G>A	Arg180His	17	7	10	2	3					1	1																			0.71 (0.23-2.07); 0.63	
WT	541C>T	Arg181Cys	30	18	12	1			2	6	2	2	1																			1.70 (0.77-3.86); 0.20	
WT	542G>A	Arg181His	81	30	51	1	4																	1	16	18	3	16				0.65 (0.40-1.04); 0.06	
WT	715G>A	Glu239Lys	25	15	10			2	1	1	2	1	2	1							1	2	1	2								1.63 (0.68-4.06); 0.24	
WT	755G>A	Ser252Asn	33	16	17	1	1																									1.20 (0.57-2.52); 0.60	
WT	1091T>C	Ile364Thr	15	10	5				1	1		3																					1.87 (0.58-6.98); 0.31
WT	1111C>T	His371Tyr	91	33	58	2	1																									0.72 (0.45-1.12); 0.14	
WT	1141A>G	Met381Val	17	10	7	1	3																									1.63 (0.56-5.04); 0.34	
WT	1195G>A	Val399Ile	33	14	19																												0.82 (0.38-1.73); 0.60
WT	1217G>A	Arg406His	24	6	18	1	7		1																								0.45 (0.15-1.18); 0.10
WT	1283C>T	Ser428Phe	70	42	28	1	1					2	1	2																			1.57 (0.95-2.62); 0.07
WT	1336A>G	Asn446Asp	39	18	21	1	4		1																								1.05 (0.53-2.07); 0.87
WT	1427C>T	Thr476Met	161	101	60	17	16	3	6	5	2	18	4	14	1		3	2	2	1	4											1.88 (1.35-2.64); 9.7E-5	
WT	1489G>A	Asp497Asn	27	14	13	1	3																										1.24 (0.54-2.86); 0.70
WT	1513T>A	Ser505Thr	54	17	37																												0.56 (0.30-1.02); 0.055
other WT (164 variants)			496	270	226	28	33	13	21	13	3	29	2	8	2	9	2	3	3	28	5	23	28	3	10	1						1.45 (1.22-1.73); 4.0E-5	
All WT/IM - discordant (49 variants)			451	262	189	28	33	11	35	25	5	22	5	7	13	7	3																1.68 (1.40-2.03); 4.4E-8
All intermediate (IM; 11 variants)			1382	778	604	27	53	4	37	178	61	105	47	19	22	7	3																1.57 (1.41-1.75); 9.1E-17
IM	470T>C	Ile157Thr	964	579	385	20	45	2	30	175	59	99	47	17	22	6	2																1.59 (1.40-1.82); 1.6E-12
IM	1215C>A	Asn405Lys	19	10	9	3	6																										1.18 (0.43-3.29); 0.82
IM	1343T>G	Ile448Ser	360	165	195	1			7			3																					1.03 (0.83-1.28); 0.79
other IM (8 variants)			39	24	15	4	1	2	0	2	2	3																					1.94 (1.02-3.70); 0.04
All IM/ID - discordant (22 variants)			117	68	49	6	9	4	13	1		7	1	1	3	1	2	2	8	2	1	2											1.68 (1.17-2.43); 6.5E-3
All impaired (ID; 77 variants)			532	372	160	38	24	18	19	20	1	67	8	15	8	15	4	23	6	49	12	24	14	3	5	1							2.83 (2.35-3.41); 2.4E-30
ID	349A>G	Arg117Gly	110	76	34	9	5	4	5	1		13	4	5	1	4	2	13	4	7	2												2.38 (1.59-3.57); 1.4E-5
ID	433C>T	Arg145Trp	20	15	5							7	2																				2.56 (0.88-9.00); 0.07
ID	499G>A	Gly167Arg	14	11	3	1						5		1																			4.09 (1.08-22.81); 0.03
ID	1036C>T	Arg346Cys	27	23	4	6						6																					5.85 (2.00-16.92); 2.1E-4
ID	1117A>G	Lys373Glu	23	20	3																												10.8 (3.20-56.75); 4.2E-6
ID	1169A>C	Tyr390Ser	15	13	2				1	3		3																					6.17 (1.40-27.33); 6.2E-3
ID	1175C>T	Ala392Val	20	15	5							5																					2.54 (0.88-8.94); 0.07
ID	1420C>T	Arg474Cys	18	12	6			2	3																								2.43 (0.84-7.89); 0.10
ID	1421G>A	Arg474His	38	29	9	1	2	9	3	3		6																					3.68 (1.70-8.84); 2.6E-4
DNL	1561C>T	Arg521Trp	49	29	20			1	2																								2.00 (1.09-3.73); 0.02
other ID/DNL (N=67)			198	129	69	21	14	1	6	10	1	20	2	6	4	3																	2.27 (1.70-3.04); 1.6E-8
All WT/ID - discordant (19 variants)			153	79	74	8	8		7	4	1	4	1	2	1	4	4	1	1	5	3	25	14										1.30 (0.94-1.78); 0.13
Legend:						1-9 carriers			10-99 carriers			>99 carriers			Patients			Controls															

Obrázek 20: Analyzované missense varianty *CHEK2* nalezené u pacientek s karcinomem prsu (BC, červená čísla) a populačně specifických kontrol (tmavě zelená čísla) rozdělené podle funkčních testů do tří kategorií. Souvislost s rizikem vzniku karcinomu prsu (*odds ratio*; OR) byla vypočtena pro nalezené u ≥ 10 nosičů mezi pacienty, resp. kontrolami. Barvy čísel v posledním sloupci zvýrazňují významnou asociaci variant se středním nebo vysokým rizikem (červená; $OR > 2$), variant s nízkým rizikem (žlutá; $OR < 2$), protektivní varianty (zelená) nebo varianty bez významného dopadu na riziko vzniku karcinomu prsu (černá). V šedých řádcích jsou zobrazeny varianty, které byly ve funkčních testech diskordantní. DNL, varianty, které se nelokalizují do jádra.

Výsledky této komplexní mezinárodní studie umožňují přesvědčivou interpretaci většiny častých zárodečných missense variant *CHEK2* identifikovaných u pacientek s karcinomem prsu z různých populací ve světě.

5. Závěr

Předkládaná disertační práce se zabývá komplexní analýzou nádorových predispozičních genů u vysoce rizikových pacientů s hepatocelulárním karcinomem, velmi mladých pacientek s karcinomem ovaria, pacientek s karcinomem endometria, pacientů s karcinomem prsu u mužů v české populaci, které doposud nebyly v České republice systematicky studovány.

Zavedením NGS do rutinního testování nádorové predispozice před necelým desetiletím výrazně vzrostl počet vyšetření dědičné nádorové predispozice a tím i počet identifikovaných variant v analyzovaných genech. Podstatnou část nalezených variant tvoří VUS, alterace s nejasným klinickým významem. Přítomnost VUS značně komplikuje interpretaci genetických vyšetření u vysoce rizikových osob a je zdrojem diagnostických rozpaků a desinterpretací na straně kliniky a zklamání na straně vyšetřovaných osob [190-193]. Mnoho těchto variant se nachází v tzv. kandidátních genech jejichž asociace s nádorovým onemocněním je analyzována na základě rozsáhlých populačních studií, meta-analýz nebo funkčních analýz. Zařazení kandidátního genu na seznam klinicky relevantních predispozičních genů je zdoluhavý proces a vyžaduje získání dostatečně významného (a statisticky silného) průkazu asociace variant se vznikem onemocnění [194-196]. V rámci disertační práce jsme se proto u vyšetřovaných setů pacientů a kontrol systematicky věnovali zárodečným alteracím v genech MRN komplexu (*MRE11*, *RAD50*, *NBN*), které řada studií mezi kandidátní geny spojené zejména s rizikem vzniku karcinomu prsu řadí, nicméně výsledek studií s hodnocením rizik není jednoznačný [15, 16, 54, 197-201]. Vzhledem k tomu, že u pacientů z evropských slovanských zemí je rekurentně pozorována slovanská zakladatelská varianta v genu *NBN* c.657del5 patří ČR mezi evropské země s nejvyšší prevalencí variant v *NBN*. Z tohoto důvodu jsme připravili souhrnnou meta-analýzu publikovaných studií, které analyzovaly zárodečné patogenní varianty v genech MRN komplexu u pacientů s různými typy nádorových onemocnění. Abychom mohli vyhodnotit asociaci patogenních variant s širší škálou různých nádorových onemocnění, provedli jsme také sekundární analýzu, která zahrnovala nejen *case-control* analýzy, ale i případové studie bez kontrolních skupin. Výsledky jednoznačně ukázaly, že ani jeden z genů MRN komplexu neasociuje se zvýšeným rizikem karcinomu prsu. Hraniční asociace s karcinomem ovaria je podle našich výsledků spojena s nosičstvím patogenních variant v *MRE11* a *NBN*. Klinicky významným výsledkem naší studie je asociace dědičných patogenních variant se středně zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prostaty, melanomu, ZN slinivky a hematologických nádorů. Rizika nádorových onemocnění v asociaci s *NBN* variantami vyhodnocená touto meta-analýzou jsou důležitým podpůrným důkazem, že v doporučených postupech prevence nádorových onemocnění by mělo být nosičství variant v genu *NBN* zohledněno.

Ve vybraných kandidátních predispozičních genech jsme provedli funkční charakterizaci nalezených VUS variant. V rámci národního konsorcia CZEKANCA byla identifikována u

pacientů s různými nádorovými onemocněními celá řada trunkačních variant, včetně rekurentní varianty c.313G>T (p.E105X), což naznačovalo možnost, že by germinální varianty *FANCG*, podobně jako i v dalších FA genech, mohly predisponovat ke vzniku onkologických onemocnění. Tuto hypotézu vyvrátily dodatečně provedené analýzy rozsáhlé skupiny 3 250 neselektovaných kontrol analyzovaných NGS panelem CZECA-NCA, ve kterých se prevalence nosičství trunkačních variant ve *FANCG* ukázala stejně četná v porovnání s analyzovanými daty pacientů. Funkční analýza založená na hodnocení reparační kapacity *FANCG* ukázala, že hodnocené vzácné missense varianty si zachovávají plnou funkční kapacitu a nosičky heterozygotních variant v genu *FANCG* tedy nemají zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu ani karcinomu ovarií.

V rozsáhlé mezinárodní studii jsme funkční analýzou hodnotící katalytickou účinnost CHK2 kinázy kódovanou genem *CHEK2* kategorizovali 340/460 missense variant nejasného významu [13]. Ačkoliv tato robustní analýza umožnila stratifikovat velké množství shromážděných missense variant, stále zbývá ohodnotit některé varianty (**Tabulka 7**), které jsou u pacientek s karcinomem prsu časté, nicméně v rámci obou esejí (fosforylace KAP1-S473 a autofosforylace CHK2-S516) vychází diskordantně. K jejich funkční stratifikaci bude tedy zapotřebí jiné metody umožňující jejich funkční analýzu.

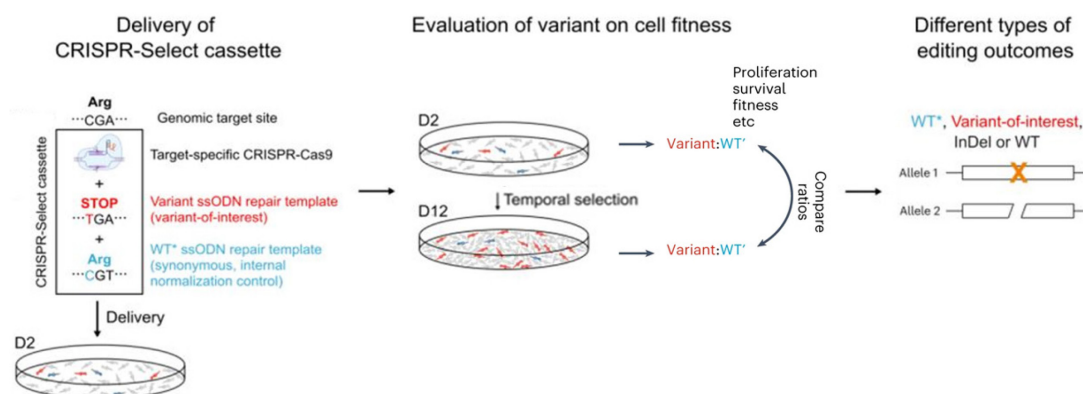
Tabulka 7: Diskordantní varianty genu *CHEK2* vhodné k dalším analýzám.

Variant	KAP1 pS473	CHK2 pS516	konkordance	N	OR; 95%CI; p-hodnota
c.176C>A p.Thr59Lys	IM	WT	WT/IM	24	0,72; 0,31-1,66; 0,54
c.190G>A p.Glu64Lys	IM	WT	WT/IM	101	3,01; 1,95-4,64; 1,81×10 ⁻⁷
c.556A>C p.Asn486His	ID	IM	ID/IM	28	0,48; 0,21-1,1; 0,08
c.692G>A p.Cys231Tyr	WT	IM	WT/IM	11	0,45; 0,12-1,72; 0,36
c.727T>C p.Cys243Arg	ID	IM	ID/IM	15	1,06; 0,38-2,92; 1
c.751A>T p.Ile251Phe	ID	IM	ID/IM	18	3,15; 1,13-8,85; 0,03
c.886G>T p.Asp296Tyr	ID	WT	ID/WT	16	2,67; 0,92-7,69; 0,07
c.953G>A p.Arg318His	IM	WT	WT/IM	10	1,21; 0,35-4,19; 0,76
c.1003G>C p.Val335Leu	WT	IM	WT/IM	11	1,01; 0,31-3,31; 1
c.1067c>T p.Ser356Leu	IM	WT	WT/IM	12	2,42; 0,73-8,06; 0,58
c.1125G>C p.Leu375Phe	ID	WT	ID/WT	10	0,81; 0,22-2,86; 1
c.1216C>T p.Arg406Cys	ID	IM	ID/IM	13	1,42; 0,47-4,21; 0,58
c.1270T>C p.Tyr424His	IM	WT	WT/IM	44	2,34; 1,25-4,37; 0,006
c.1312G>T p.Asp438Tyr	IM	WT	WT/IM	140	1,44; 1,03-2,01; 0,03
c.1357G>C p.Ala453Pro	ID	WT	ID/WT	26	2,29; 1,02-5,14; 0,04
c.1383C>G p.Asp461Glu	WT	IM	WT/IM	10	0,52; 0,13-2,01; 0,52
c.1525C>T p.Pro509Ser	WT	ID	ID/WT	32	0,94; 0,46-1,18; 1
c.1556G>T p.Arg519Leu	WT	ID	ID/WT	37	0,58; 0,29-1,16; 0,13

Legenda: WT, *wild-type* fenotyp; IM, funkčně intermediární; ID, katalyticky nefunkční; OR, odds ratio

Jako vhodná funkční analýza, která by umožnila vyhodnocení těchto diskordantních variant se ukázala metoda CRISPR-Select^{TIME} [202] vyvinutá laboratorí prof. Clause Storgaard Sørensen na Univerzitě v Kodani, kde jsem si během dvouměsíční pracovní stáže osvojila princip této metody, který nyní můžeme v rámci funkčních analýz v Laboratoři nádorové buňky pro hodnocení variant nejasného významu použít.

Metoda CRISPR-Select je založená na knock-in editaci genomu, kdy je pomocí CRISPR-Cas9 technologie zavedena do buněk testovaná varianta a kontrolní (neutrální) silent varianta (**Obrázek 21**). Následně je v závislosti na čase sledována pomocí sekvenování nové generace absolutní frekvence testované varianty vůči absolutní frekvenci silent varianty v buněčné populaci, která umožní vyhodnotit vliv dané varianty na proliferaci nebo přežívání buněk. Tato metoda umožňuje testovat jakékoliv varianty nejasného významu v různých genech zájmu a její univerzálnost a modifikovatelnost umožňuje širokou škálu aplikací.



Obrázek 21: Princip metody CRISPR-Select^{TIME}. V prvním kroku je buněčná populace transfekována CRISPR-Select kazetou, která obsahuje specifickou guideRNA, dva identické ssODN oligonukleotidy jeden s variantou našeho zájmu a druhý s kontrolní silent variantou (WT*). Po dvou a dvanácti dnech je z buněk izolována genomová DNA a vyhodnocena míra proliferace nebo přežití buněk. Převzato z [202].

V rámci disertační práce byly optimalizovány a zavedeny efektivní přístupy funkčních analýz variant nejasného významu, které umožňují snižovat množství detekovaných variant bez jasného dopadu na sestřih pre-mRNA nebo funkci proteinu. Výsledky naší práce jsou důležitým příspěvkem především k aplikovanému výzkumu a mohou poskytnout porozumění genetickým predispozicím spojeným s různými typy zhoubných nádorů, což může přispět k lepší klasifikaci, diagnostice či prevenci těchto nádorů v České republice.

6. Seznam publikací týkající se této disertační práce

1. Horackova K, Frankova S, Zemankova P, Nehasil P, Cerna M, Neroldova M, **Otahalova B**, Kral J, Hovhannisyan M, Stranecky V, Zima T, Safarikova M, Kalousova M, 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*. 2023; 15(1):201. (IF₂₀₂₃=4.5)
2. Hovhannisyan M, Zemankova P, Nehasil P, Matejkova K, Borecka M, Cerna M, Dolezalova T, Dvorakova L, Foretova L, Horackova K, Jelinkova S, Just P, Kalousova M, Kral J, Machackova E, Nemcova B, Safarikova M, Springer D, **Stastna B**, Tavandzis S, Vocka M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Ernst C, Kleibl Z, Janatova M, **Population-specific validation and comparison of the performance of 77- and 313-variant polygenic risk scores for breast cancer risk prediction,** *Cancer*, 2024 May 8 (IF₂₀₂₃=6,1)
3. Horackova K, Zemankova P, Nehasil P, Vocka M, Hovhannisyan M, Matejkova K, Janatova M, Cerna M, Kleiblova P, Jelinkova S, **Stastna B**, Just P, Dolezalova T, Nemcova B, Urbanova M, Koudova M, Hazova J, Machackova E, Foretova L, Stranecky V, Zikan M, Kleibl Z, Soukupova J. **A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer.** *Sci Rep*, 2024 Jul 13;14(1):16183 (IF₂₀₂₃=3,8)
4. Kral J, Jelinkova S, Zemankova P, Vocka M, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Dostalek L, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Chvojka S, Kalousova M, Kosarova M, Koudova M, Krutilkova V, Machackova E, Nehasil P, Novotny J, **Otahalova B**, Puchmajerova A, Safarikova M, Slama J, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Zikan M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Kleibl Z, Janatova M, **Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer,** *Oncol Lett* 2023, 25(6): 216. (IF₂₀₂₃=2,5)
5. Janatová M, Borecká M, Zemánková P, Matějková K, Nehasil P, Černá L, Černá M, Dušková P, Doležalová T, Foretová L, Havránek O, Házová J, Horáčková K, Hovhannisyan M, Hrušková L, Chvojka Š, Janíková M, Kalousová M, Kosařová M, Koudová M, Krhutová V, Krulišová V, Macháčková E, Michalovská R, Němcová B, Novotný J, Šafaříková M, **Šťastná B**, Stránecký V, Šubrt I, Tavandzis S, Vlčková Z, Vočka M, Vrtěl R, Zima T, Soukupová J, Kleiblová P, Kleibl Z. **Genetic Predisposition to Male Breast Cancer.** *Folia Biol (Praha)*, 2024;70(5-6):274-284 (IF₂₀₂₃=1,1)
6. **Otahalova B**, Volkova Z, Soukupova J, Kleiblova P, Janatova M, Vocka M, Macurek L, Kleibl Z, **Importance of Germline and Somatic Alterations in Human MRE11, RAD50, and NBN Genes Coding for MRN Complex,** *Int J Mol Sci*, 2023; 24(6):5612, (IF₂₀₂₂=4,9)
7. **Stastna B**, Dolezalova T, Matejkova K, Nemcova B, Zemankova P, Janatova M, Kleiblova P, Soukupova J, Kleibl Z. **Germline pathogenic variants in the MRE11, RAD50, and NBN (MRN) genes in cancer predisposition: A systematic review and meta-analysis.** *Int J Cancer*, 2024 Jun 26. (IF₂₀₂₃=5,7)
8. Kleiblova P, Cerna M, Zemankova P, Matejkova K, Nehasil P, Hojny J, Horackova K, Janatova M, Soukupova J, **Stastna B**, Kleibl Z. **Parallel DNA/RNA NGS using identical target enrichment panel in the analysis of hereditary cancer predisposition,** *Folia Biol (Praha)*; 2024; 70: 62-73, (IF₂₀₂₃=1,1)
9. Cerna M*, **Stastna B***, Pesek P, Dolezalova T, Janatova M, Soukupova J, Horackova K, Kleiblova P, **Semi-automated RNA isolation from Tempus Blood RNA tubes using the MagCore Plus II instrument,** *Folia Biol* 2025, accepted (IF₂₀₂₃=1,1). * sdílené první autorství

10. Zemankova P, Cerna M, Horackova K, Ernst C, Soukupova J, Borecka M, Blümcke B, Cerna L, Cerna M, Curtisova V, Dolezalova T, Duskova P, Dvorakova L, Foretova L, Havranek O, Hauke J, Hahnen E, Hodulova M, Hovhannisyan M, Hruskova L, Janatova M, Janikova M, Jelinkova S, Just P, Kosarova M, Koudova M, Krutilkova V, Machackova E, Matejkova K, Michalovska R, Misove A, Nehasil P, Nemcova B, Novotny J, Panczak A, Pesek P, Scheinost O, Springer D, **Stastna B**, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Tureckova E, Vesela K, Vlckova Z, Vocka M, Wappenschmidt B, Zima T, Kleibl Z, Kleiblova P, **A deep intronic recurrent *CHEK2* variant c.1009-118_1009-87delinsC affects pre-mRNA splicing and contributes to hereditary breast cancer predisposition**, *Breast*, 2024 Mar 25;75:103721. (IF₂₀₂₃=5,7)
11. Soukupova J*, **Stastna B***, Kanwal M, Hojny J, Zemankova P, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Cerna M, Curtisova V, Dolezalova T, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Hruskova L, Chvojka S, Janatova M, Janikova M, Jelinkova S, Just P, Kalousova M, Kleiblova P, Kosarova M, Koudova M, Kral J, Krausova M, Krutilkova V, Machackova E, Matejkova K, Michalovska R, Nehasil P, Nemcova B, Novotny J, Palek M, Pesek P, Safarikova M, Scheinost O, Springer D, Stolarova L, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Tureckova E, Vesela K, Vlckova Z, Vocka M, Zima T, Macurek L, Kleibl Z. CZECANCA consortium, **A comprehensive study evaluating germline *FANCG* variants in predisposition to breast and ovarian cancer**. *Cancer Med*, 2024 Aug;13(16):e70103 (IF₂₀₂₃=2,9). * sdílené první autorství
12. Stolarova L, Kleiblova P, Zemankova P, **Stastna B**, Janatova M, Soukupova J, Achatz MI, Ambrosone C, Apostolou P, Arun BK, Auer P, Barnard M, Bertelsen B; Biobank Japan; Blok MJ, Boddicker N, Brunet J, Burnside ES, Calvello M, Campbell I, Chan SH, Chen F, Chiang JB, Coppa A, Cortesi L, Crujeiras-González A; Consortium CZECANCA; De Leeneer K, De Putter R, DePersia A, Devereux L, Domchek S, Efremidis A, Engel C, Ernst C, Evans DGR, Feliubadaló L, Fostira F, Fuentes-Ríos O, Gómez-García EB, González S, Haiman C, Hansen TVO, Hauke J, Hodge J, Hu C, Huang H, Ishak NDB, Iwasaki Y, Konstantopoulou I, Kraft P, Lacey J, Lázaro C, Li N, Lim WK, Lindstrom S, Lori A, Martínez E, Martins A, Matsuda K, Matullo G, McInerny S, Michailidou K, Montagna M, Monteiro ANA, Mori L, Nathanson K, Neuhausen SL, Nevanlinna H, Olson JE, Palmer J, Pasini B, Patel A, Piane M, Poppe B, Radice P, Renieri A, Resta N, Richardson ME, Rosseel T, Ruddy KJ, Santamariña M, Dos Santos ES, Teras L, Toland AE, Trentham-Dietz A, Vachon CM, Volk AE, Weber-Lassalle N, Weitzel JN, Wiesmuller L, Winham S, Yadav S, Yannoukakos D, Yao S, Zampiga V, Zethoven M, Zhang ZW, Zima T, Spurdle AB, Vega A, Rossing M, Del Valle J, De Nicolo A, Hahnen E, Claes KBM, Ngeow J, Momozawa Y, James PA, Couch FJ, Macurek L, Kleibl Z, **ENIGMA *CHEK2*gether project: a comprehensive study identifies functionally-impaired *CHEK2* germline missense variants associated with increased breast cancer risk**, *Clin Cancer Res*, 2023 Aug 15;29(16):3037-3050, (IF₂₀₂₃=10,0)

7. Seznam literatury

1. ÚZIS, *Zdravotnická ročenka České republiky 2021*. 2022.
2. ÚZIS, *Novotvary 2019–2021 ČR: Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice*. . 2023.
3. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Knudson, A.G., *Cancer genetics*. Am J Med Genet, 2002. **111**(1): p. 96-102.
7. Novotný J., V.P., Kleibl Z., *Onkologie v klinické praxi* Vol. 3. vydání. 2019: Mladá fronta a.s.
8. Rahman, N., *Mainstreaming genetic testing of cancer predisposition genes*. Clin Med (Lond), 2014. **14**(4): p. 436-9.
9. Kulkarni, A. and H. Carley, *Advances in the recognition and management of hereditary cancer*. Br Med Bull, 2016. **120**(1): p. 123-138.
10. Foretová L., M.E., Gaillyová R. a kolektiv, *Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi*. 2022, Praha: Grada Publishing.
11. Pohlreich, P., et al., *High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(5): p. R728-36.
12. Stratton, M.R. and N. Rahman, *The emerging landscape of breast cancer susceptibility*. Nat Genet, 2008. **40**(1): p. 17-22.
13. Stolarova, L., et al., *ENIGMA CHEK2gether Project: A Comprehensive Study Identifies Functionally Impaired CHEK2 Germline Missense Variants Associated with Increased Breast Cancer Risk*. Clin Cancer Res, 2023. **29**(16): p. 3037-3050.
14. Zimovjanová, M., *Hereditární karcinom prsu Příklad vzácnější formy karcinomu prsu v populaci*. Onkologie 2009. **3**: p. 348-350.
15. Hu, C., et al., *A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer*. N Engl J Med, 2021. **384**(5): p. 440-451.
16. Breast Cancer Association, C., et al., *Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women*. N Engl J Med, 2021. **384**(5): p. 428-439.
17. Janatová, M., et al., *Genetic Predisposition to Male Breast Cancer*. Folia Biol (Praha), 2024. **70**(5-6): p. 274-284.
18. Fox, S., V. Speirs, and A.M. Shaaban, *Male breast cancer: an update*. Virchows Arch, 2022. **480**(1): p. 85-93.
19. Lhotova, K., et al., *Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer*. Cancers (Basel), 2020. **12**(4).
20. NCCN. *Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, Pancreatic and Prostate (Version 3.2025)*. 2025; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bopp.pdf.
21. Borecka, M., et al., *Mutation analysis of the PALB2 gene in unselected pancreatic cancer patients in the Czech Republic*. Cancer Genet, 2016. **209**(5): p. 199-204.
22. Wieme, G., et al., *Prevalence of Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposing Genes in Czech and Belgian Pancreatic Cancer Patients*. Cancers (Basel), 2021. **13**(17).
23. Heidegger, I., et al., *Hereditary prostate cancer - Primetime for genetic testing?* Cancer Treat Rev, 2019. **81**: p. 101927.
24. Braun, M.M., E.A. Overbeek-Wager, and R.J. Grumbo, *Diagnosis and Management of Endometrial Cancer*. Am Fam Physician, 2016. **93**(6): p. 468-74.
25. Kondrashova, O., et al., *Tumor Signature Analysis Implicates Hereditary Cancer Genes in Endometrial Cancer Development*. Cancers (Basel), 2021. **13**(8).
26. Spurdle, A.B., et al., *Endometrial cancer gene panels: clinical diagnostic vs research germline DNA testing*. Mod Pathol, 2017. **30**(8): p. 1048-1068.

27. Kral, J., et al., *Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer*. *Oncol Lett*, 2023. **25**(6): p. 216.
28. Yang, J.D., et al., *A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019. **16**(10): p. 589-604.
29. Uson Junior, P.L., et al., *Germline Cancer Susceptibility Gene Testing in Unselected Patients with Hepatobiliary Cancers: A Multi-Center Prospective Study*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2022. **15**(2): p. 121-128.
30. Mezina, A., et al., *Multigene Panel Testing in Individuals With Hepatocellular Carcinoma Identifies Pathogenic Germline Variants*. *JCO Precis Oncol*, 2021. **5**.
31. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. *Genet Med*, 2015. **17**(5): p. 405-24.
32. Brnich, S.E., E.A. Rivera-Muñoz, and J.S. Berg, *Quantifying the potential of functional evidence to reclassify variants of uncertain significance in the categorical and Bayesian interpretation frameworks*. *Hum Mutat*, 2018. **39**(11): p. 1531-1541.
33. Monteiro, A.N., et al., *Variants of uncertain clinical significance in hereditary breast and ovarian cancer genes: best practices in functional analysis for clinical annotation*. *J Med Genet*, 2020. **57**(8): p. 509-518.
34. Neuhausen, S.L., *Founder populations and their uses for breast cancer genetics*. *Breast Cancer Res*, 2000. **2**(2): p. 77-81.
35. Hovhannisyan, M., et al., *Polygenic risk score (PRS) and its potential for breast cancer risk stratification*. *Klin Onkol*, 2023. **36**(3): p. 198-205.
36. Otahalova, B., et al., *Importance of Germline and Somatic Alterations in Human MRE11, RAD50, and NBN Genes Coding for MRN Complex*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(6).
37. Qiu, S. and J. Huang, *MRN complex is an essential effector of DNA damage repair*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2021. **22**(1): p. 31-37.
38. Lee, K.C., et al., *MRE11 facilitates the removal of human topoisomerase II complexes from genomic DNA*. *Biol Open*, 2012. **1**(9): p. 863-73.
39. Kashhammer, L., et al., *Mechanism of DNA End Sensing and Processing by the Mre11-Rad50 Complex*. *Mol Cell*, 2019. **76**(3): p. 382-394 e6.
40. Lafrance-Vanasse, J., G.J. Williams, and J.A. Tainer, *Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2015. **117**(2-3): p. 182-193.
41. Hirasawa, A., et al., *Prevalence of pathogenic germline variants detected by multigene sequencing in unselected Japanese patients with ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(68): p. 112258-112267.
42. Deshpande, R.A., et al., *DNA-dependent protein kinase promotes DNA end processing by MRN and CtIP*. *Sci Adv*, 2020. **6**(2): p. eaay0922.
43. Lamarche, B.J., N.I. Orazio, and M.D. Weitzman, *The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(17): p. 3682-95.
44. Syed, A. and J.A. Tainer, *The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair*. *Annu Rev Biochem*, 2018. **87**: p. 263-294.
45. Schlacher, K., et al., *Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11*. *Cell*, 2011. **145**(4): p. 529-42.
46. Roy, S., et al., *p53 orchestrates DNA replication restart homeostasis by suppressing mutagenic RAD52 and POLθ pathways*. *Elife*, 2018. **7**.
47. Chrzanowska, K.H., et al., *Nijmegen breakage syndrome (NBS)*. *Orphanet J Rare Dis*, 2012. **7**(1): p. 13.
48. Seemanova, E., et al., *The Slavic NBN Founder Mutation: A Role for Reproductive Fitness?* *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0167984.
49. Taylor, A.M.R., et al., *Chromosome instability syndromes*. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. **5**(1): p. 64.
50. Pollard, J.M. and R.A. Gatti, *Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009. **74**(5): p. 1323-31.

51. Mahale, R.R., et al., *A Rare Case of Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder With MRE11 Mutation*. J Pediatr Neurosci, 2020. **15**(3): p. 283-285.
52. Takagi, M., et al., *Bone Marrow Failure and Immunodeficiency Associated with Human RAD50 Variants*. J Clin Immunol, 2023. **43**(8): p. 2136-2145.
53. Ragamin, A., et al., *Human RAD50 deficiency: Confirmation of a distinctive phenotype*. Am J Med Genet A, 2020. **182**(6): p. 1378-1386.
54. Steffen, J., et al., *Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland*. Int J Cancer, 2004. **111**(1): p. 67-71.
55. Stolarova, L., 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, 2020. **8**(10).
56. Kurian, A.W., et al., *Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women*. JCO Precis Oncol, 2017. **1**: p. 1-12.
57. Borecka, M., et al., *The c.657del5 variant in the NBN gene predisposes to pancreatic cancer*. Gene, 2016. **587**(2): p. 169-72.
58. Lener, M.R., et al., *Do founder mutations characteristic of some cancer sites also predispose to pancreatic cancer?* Int J Cancer, 2016. **139**(3): p. 601-6.
59. Cybulski, C., et al., *NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1215-9.
60. Cybulski, C., et al., *An inherited NBN mutation is associated with poor prognosis prostate cancer*. Br J Cancer, 2013. **108**(2): p. 461-8.
61. Soucek, P., et al., *Multiplex single-tube screening for mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome (NBS1) gene in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma patients of Slavic origin*. Eur J Hum Genet, 2003. **11**(5): p. 416-9.
62. Yamaguchi, T., et al., *Accumulation profile of frameshift mutations during development and progression of colorectal cancer from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Dis Colon Rectum, 2006. **49**(3): p. 399-406.
63. Wang, X., et al., *Mutational analysis of thirty-two double-strand DNA break repair genes in breast and pancreatic cancers*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 971-5.
64. Panou, V., et al., *Frequency of Germline Mutations in Cancer Susceptibility Genes in Malignant Mesothelioma*. J Clin Oncol, 2018. **36**(28): p. 2863-2871.
65. Damiola, F., et al., *Rare key functional domain missense substitutions in MRE11A, RAD50, and NBN contribute to breast cancer susceptibility: results from a Breast Cancer Family Registry case-control mutation-screening study*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(3): p. R58.
66. Bartkova, J., et al., *Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene*. Mol Oncol, 2008. **2**(4): p. 296-316.
67. Nalepa, G. and D.W. Clapp, *Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(3): p. 168-185.
68. Zhu, B., et al., *K63-linked ubiquitination of FANCG is required for its association with the Rap80-BRCA1 complex to modulate homologous recombination repair of DNA interstand crosslinks*. Oncogene, 2015. **34**(22): p. 2867-78.
69. Gianni, P., et al., *The Fanconi anemia pathway and Breast Cancer: A comprehensive review of clinical data*. Clin Breast Cancer, 2022. **22**(1): p. 10-25.
70. Song, H., et al., *Population-based targeted sequencing of 54 candidate genes identifies PALB2 as a susceptibility gene for high-grade serous ovarian cancer*. J Med Genet, 2021. **58**(5): p. 305-313.
71. van der Heijden, M.S., et al., *Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2585-8.
72. Smith, A.L., et al., *Candidate DNA repair susceptibility genes identified by exome sequencing in high-risk pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2016. **370**(2): p. 302-12.
73. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D980-5.

74. Stenson, P.D., et al., *Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update*. Hum Mutat, 2003. **21**(6): p. 577-81.
75. Jarvik, G.P. and B.L. Browning, *Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants*. Am J Hum Genet, 2016. **98**(6): p. 1077-1081.
76. Jaganathan, K., et al., *Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning*. Cell, 2019. **176**(3): p. 535-548.e24.
77. Leman, R., et al., *SPiP: Splicing Prediction Pipeline, a machine learning tool for massive detection of exonic and intronic variant effects on mRNA splicing*. Hum Mutat, 2022. **43**(12): p. 2308-2323.
78. Shamsani, J., et al., *A plugin for the Ensembl Variant Effect Predictor that uses MaxEntScan to predict variant spliceogenicity*. Bioinformatics, 2019. **35**(13): p. 2315-2317.
79. Jian, X., E. Boerwinkle, and X. Liu, *In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(22): p. 13534-44.
80. Desmet, F.O., et al., *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(9): p. e67.
81. Kleiblová, P., et al., *Parallel DNA/RNA NGS Using an Identical Target Enrichment Panel in the Analysis of Hereditary Cancer Predisposition*. Folia Biol (Praha), 2024. **70**(1): p. 62-73.
82. Thouvenot, P., et al., *Functional Assessment of Genetic Variants with Outcomes Adapted to Clinical Decision-Making*. PLoS Genet, 2016. **12**(6): p. e1006096.
83. Woods, N.T., et al., *Functional assays provide a robust tool for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance*. NPJ Genom Med, 2016. **1**: p. 16001-.
84. Claussnitzer, M., et al., *Minimum information and guidelines for reporting a multiplexed assay of variant effect*. Genome Biol, 2024. **25**(1): p. 100.
85. Esposito, D., et al., *MaveDB: an open-source platform to distribute and interpret data from multiplexed assays of variant effect*. Genome Biol, 2019. **20**(1): p. 223.
86. CZEKANCA konsorcium. Available from: <http://www.czecanca.cz/>.
87. *A powerful tool for mapping of short reads onto a reference genome*. Available from: <https://www.novocraft.com/products/novoalign/>.
88. *Picard toolkit*. Available from: <https://broadinstitute.github.io/picard/>.
89. <https://broadinstitute.github.io/picard/>.
90. Cingolani, P., et al., *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 (Austin), 2012. **6**(2): p. 80-92.
91. *Pindel*. Available from: <https://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>.
92. *Copy number variation toolkit for high-throughput sequencing*; Available from: <https://pypi.org/project/CNVkit/>.
93. *Integrative Genomics Viewer*. Available from: <https://igv.org/>.
94. *Copy Number Variant Detection* Available from: https://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/biomedicalgenomicsworkbench/300/index.php?manual=Copy_Number_Variant_Detection.html
95. Hovhannisyan, M., et al., *Population-specific validation and comparison of the performance of 77- and 313-variant polygenic risk scores for breast cancer risk prediction*. Cancer, 2024. **130**(17): p. 2978-2987.
96. Wang, S., et al., *SpecHLA enables full-resolution HLA typing from sequencing data*. Cell Rep Methods, 2023. **3**(9): p. 100589.
97. Horackova, K.F., S.; Zemankova, P.; Nehasil, P.; Cerna, M.; Neroldova, M.; Otahalova, B.; Kral, J.; Hovhannisyan, 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 2023. **15**(1).
98. Stastna, B., et al., *Germline pathogenic variants in the MRE11, RAD50, and NBN (MRN) genes in cancer predisposition: A systematic review and meta-analysis*. Int J Cancer, 2024.

99. Rybicka, M., et al., *Liver Cirrhosis in Chronic Hepatitis B Patients Is Associated with Genetic Variations in DNA Repair Pathway Genes*. *Cancers* (Basel), 2020. **12**(11).
100. Zhen, Y., et al., *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**: p. 563-569.
101. Dumon-Jones, V., et al., *Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2003. **63**(21): p. 7263-9.
102. Mukama, T., et al., *Familial risk of breast cancer by dynamic, accumulative, and static definitions of family history*. *Cancer*, 2020. **126**(12): p. 2837-2848.
103. Ghoussaini, M., et al., *Genome-wide association analysis identifies three new breast cancer susceptibility loci*. *Nat Genet*, 2012. **44**(3): p. 312-8.
104. Gracia-Aznarez, F.J., et al., *Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e55681.
105. Easton, D.F., et al., *Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1087-93.
106. Kleibl, Z. and V.N. Kristensen, *Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management*. *Breast*, 2016. **28**: p. 136-44.
107. Michailidou, K., et al., *Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer*. *Nat Genet*, 2015. **47**(4): p. 373-80.
108. Stratton, J.F., et al., *The genetic epidemiology of early-onset epithelial ovarian cancer: a population-based study*. *Am J Hum Genet*, 1999. **65**(6): p. 1725-32.
109. SEER. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.
110. Pearce, C.L., et al., *Population distribution of lifetime risk of ovarian cancer in the United States*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015. **24**(4): p. 671-676.
111. Stolarova, L., et al., *CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate*. *Cells*, 2020. **9**(12).
112. Kurian, A.W., et al., *Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients*. *J Clin Oncol*, 2019. **37**(15): p. 1305-1315.
113. Carter, N.J., et al., *Germline pathogenic variants identified in women with ovarian tumors*. *Gynecol Oncol*, 2018. **151**(3): p. 481-488.
114. Mavaddat, N., et al., *Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes*. *Am J Hum Genet*, 2019. **104**(1): p. 21-34.
115. Kübler, K., et al., *HLA-class II haplotype associations with ovarian cancer*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(12): p. 2980-5.
116. Aureli, A., et al., *Breast Cancer Is Associated with Increased HLA-DRB1*11:01 and HLA-DRB1*10:01 Allele Frequency in a Population of Patients from Central Italy*. *Immunol Invest*, 2020. **49**(5): p. 489-497.
117. Horackova, K., et al., *A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer*. *Sci Rep*, 2024. **14**(1): p. 16183.
118. Suszynska, M., et al., *Large-scale meta-analysis of mutations identified in panels of breast/ovarian cancer-related genes - Providing evidence of cancer predisposition genes*. *Gynecol Oncol*, 2019. **153**(2): p. 452-462.
119. Lortet-Tieulent, J., et al., *International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978-2013*. *J Natl Cancer Inst*, 2018. **110**(4): p. 354-361.
120. Daniels, M.S. and K.H. Lu, *Genetic predisposition in gynecologic cancers*. *Semin Oncol*, 2016. **43**(5): p. 543-547.
121. LaDuca, H., 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*, 2020. **22**(2): p. 407-415.
122. León-Castillo, A., et al., *Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma*. *J Pathol*, 2020. **250**(3): p. 323-335.
123. Yen, T.T., et al., *Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer*. *Int J Gynecol Pathol*, 2020. **39**(1): p. 26-35.

124. Evans, D.G., et al., *Pathogenic variant detection rate varies considerably in male breast cancer families and sporadic cases: minimal additional contribution beyond BRCA2, BRCA1 and CHEK2*. J Med Genet, 2024. **61**(9): p. 853-855.
125. Scarpitta, R., et al., *Germline investigation in male breast cancer of DNA repair genes by next-generation sequencing*. Breast Cancer Res Treat, 2019. **178**(3): p. 557-564.
126. Pritzlaff, M., et al., *Male breast cancer in a multi-gene panel testing cohort: insights and unexpected results*. Breast Cancer Res Treat, 2017. **161**(3): p. 575-586.
127. Rizzolo, P., et al., *Male breast cancer: genetics, epigenetics, and ethical aspects*. Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 8**: p. viii75-viii82.
128. Bielikova, Z., et al., *Treatment and Prognosis of Male Breast Cancer: A Multicentric, Retrospective Study Over 11 Years in the Czech Republic*. Oncologist, 2024. **29**(6): p. e750-e762.
129. Kleiblová, P., et al., *The guidelines for clinical practice for carriers of germline mutations in hereditary breast, ovarian, prostate, and pancreatic cancer predisposition genes BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, and CHEK2 (4.2024)*. Klin Onkol, 2024. **37**(4): p. 292-299.
130. Campos, F.A.B., et al., *Genetic Landscape of Male Breast Cancer*. Cancers (Basel), 2021. **13**(14).
131. Rotheneder, M., et al., *Cryo-EM structure of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex reveals the molecular mechanism of scaffolding functions*. Mol Cell, 2023. **83**(2): p. 167-185.e9.
132. Belhadj, S., et al., *NBN Pathogenic Germline Variants are Associated with Pan-Cancer Susceptibility and In Vitro DNA Damage Response Defects*. Clin Cancer Res, 2023. **29**(2): p. 422-431.
133. Maser, R.S., R. Zinkel, and J.H. Petrini, *An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 417-21.
134. Seemanova, E., et al., *Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(24): p. 1875-80.
135. Salewsky, B., et al., *Directed Alternative Splicing in Nijmegen Breakage Syndrome: Proof of Principle Concerning Its Therapeutical Application*. Mol Ther, 2016. **24**(1): p. 117-24.
136. Varon, R., et al., *Mild Nijmegen breakage syndrome phenotype due to alternative splicing*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(5): p. 679-89.
137. Ciara, E., et al., *Heterozygous germ-line mutations in the NBN gene predispose to medulloblastoma in pediatric patients*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(3): p. 325-34.
138. Trubicka, J., et al., *The germline variants in DNA repair genes in pediatric medulloblastoma: a challenge for current therapeutic strategies*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 239.
139. Pardini, B., et al., *NBN 657del5 heterozygous mutations and colorectal cancer risk in the Czech Republic*. Mutat Res, 2009. **666**(1-2): p. 64-7.
140. Hebbing, S.J., et al., *Role of the Nijmegen breakage syndrome 1 gene in familial and sporadic prostate cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(5): p. 935-8.
141. Wokołorczyk, D., et al., *Mutations in ATM, NBN and BRCA2 predispose to aggressive prostate cancer in Poland*. Int J Cancer, 2020. **147**(10): p. 2793-2800.
142. Górski, B., *Selected Aspects of Molecular Diagnostics of Constitutional Alterations in BRCA1 and BRCA2 Genes Associated with Increased Risk of Breast Cancer in the Polish Population*. Hered Cancer Clin Pract, 2006. **4**(3): p. 142-52.
143. Górski, B., et al., *Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients*. Int J Cancer, 2003. **106**(3): p. 379-81.
144. Rogoża-Janiszewska, E., et al., *Prevalence of Recurrent Mutations Predisposing to Breast Cancer in Early-Onset Breast Cancer Patients from Poland*. Cancers (Basel), 2020. **12**(8).
145. Fu, F., et al., *Association between 15 known or potential breast cancer susceptibility genes and breast cancer risks in Chinese women*. Cancer Biol Med, 2021. **19**(2): p. 253-62.

146. Heikkinen, K., et al., *RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability*. Carcinogenesis, 2006. **27**(8): p. 1593-9.
147. Rostami, P., et al., *Gene Panel Testing in Hereditary Breast Cancer*. Arch Iran Med, 2020. **23**(3): p. 155-162.
148. Hsu, H.M., et al., *Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(10): p. 2024-32.
149. McPherson, M.T., et al., *Mutation Spectra of the MRN (MRE11, RAD50, NBS1/NBN) Break Sensor in Cancer Cells*. Cancers (Basel), 2020. **12**(12).
150. Li, S., et al., *Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants*. J Clin Oncol, 2022. **40**(14): p. 1529-1541.
151. Mijuskovic, M., et al., *Rare germline variants in DNA repair genes and the angiogenesis pathway predispose prostate cancer patients to develop metastatic disease*. Br J Cancer, 2018. **119**(1): p. 96-104.
152. Darst, B.F., et al., *Germline Sequencing Analysis to Inform Clinical Gene Panel Testing for Aggressive Prostate Cancer*. JAMA Oncol, 2023. **9**(11): p. 1514-1524.
153. Shi, Z., et al., *Association of germline rare pathogenic mutations in guideline-recommended genes with prostate cancer progression: A meta-analysis*. Prostate, 2022. **82**(1): p. 107-119.
154. Hu, C., et al., *Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer*. Jama, 2018. **319**(23): p. 2401-2409.
155. Yang, X., et al., *Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families*. J Clin Oncol, 2020. **38**(7): p. 674-685.
156. Laurent Francioli GT, K.K., Solomonson M, Watts N. gnomAD v2.1. 2018; Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/news/2018-10-gnomad-v2-1/>.
157. Raimondi, S., M. Suppa, and S. Gandini, *Melanoma Epidemiology and Sun Exposure*. Acta Derm Venereol, 2020. **100**(11): p. adv00136.
158. Tomasik, B., et al., *Heterozygous carriers of germline c.657_661del5 founder mutation in NBN gene are at risk of central nervous system relapse of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. Haematologica, 2018. **103**(5): p. e200-e203.
159. Heikkinen, K., et al., *Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility*. J Med Genet, 2003. **40**(12): p. e131.
160. Rebbeck, T.R., et al., *Modification of ovarian cancer risk by BRCA1/2-interacting genes in a multicenter cohort of BRCA1/2 mutation carriers*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5801-10.
161. Hong, M., et al., *RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research*. J Hematol Oncol, 2020. **13**(1): p. 166.
162. Houdayer, C., et al., *Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants*. Hum Mutat, 2012. **33**(8): p. 1228-38.
163. Acedo, A., et al., *Functional classification of BRCA2 DNA variants by splicing assays in a large minigene with 9 exons*. Hum Mutat, 2015. **36**(2): p. 210-21.
164. Machackova, E., et al., *Twenty Years of BRCA1 and BRCA2 Molecular Analysis at MMCI - Current Developments for the Classification of Variants*. Klin Onkol, 2019. **32**(Supplementum2): p. 51-71.
165. Shen, Y., et al., *Impact of RNA integrity and blood sample storage conditions on the gene expression analysis*. Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 3573-3581.
166. Vomelová, I., Z. Vanícková, and A. Sedo, *Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome*. Folia Biol (Praha), 2009. **55**(6): p. 243-51.
167. Lamot, L., I. Niemietz, and K.L. Brown, *Comparable type I interferon score determination from PAXgene and Tempus whole blood RNA collection and isolation systems*. BMC Res Notes, 2019. **12**(1): p. 511.
168. Franken, C., et al., *Peripheral blood collection: the first step towards gene expression profiling*. Biomarkers, 2016. **21**(5): p. 458-465.

169. Weber, D.G., et al., *Assessment of mRNA and microRNA Stabilization in Peripheral Human Blood for Multicenter Studies and Biobanks*. 2010(1177-2719 (Electronic)).
170. Zannini, L., D. Delia, and G. Buscemi, *CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond*. J Mol Cell Biol, 2014. **6**(6): p. 442-57.
171. Cybulski, C., et al., *CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(6): p. 1131-5.
172. Ma, X., B. Zhang, and W. Zheng, *Genetic variants associated with colorectal cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence*. Gut, 2014. **63**(2): p. 326-36.
173. Siólek, M., et al., *CHEK2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer*. Int J Cancer, 2015. **137**(3): p. 548-52.
174. Złowocka-Perłowska, E., S.A. Narod, and C. Cybulski, *CHEK2 Alleles Predispose to Renal Cancer in Poland*. JAMA Oncol, 2019. **5**(4): p. 576.
175. Havranek, O., et al., *Association of Germline CHEK2 Gene Variants with Risk and Prognosis of Non-Hodgkin Lymphoma*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140819.
176. Sutcliffe, E.G., et al., *Differences in cancer prevalence among CHEK2 carriers identified via multi-gene panel testing*. Cancer Genet, 2020. **246-247**: p. 12-17.
177. Rainville, I., et al., *High risk of breast cancer in women with biallelic pathogenic variants in CHEK2*. Breast Cancer Res Treat, 2020. **180**(2): p. 503-509.
178. Del Valle, J., et al., *Exploring the Role of Mutations in Fanconi Anemia Genes in Hereditary Cancer Patients*. Cancers (Basel), 2020. **12**(4).
179. Fang, C.B., et al., *Fanconi Anemia Pathway: Mechanisms of Breast Cancer Predisposition Development and Potential Therapeutic Targets*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 160.
180. De Rocco, D., et al., *Molecular analysis of Fanconi anemia: the experience of the Bone Marrow Failure Study Group of the Italian Association of Pediatric Onco-Hematology*. Haematologica, 2014. **99**(6): p. 1022-31.
181. Schubert, S., 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**(11): p. 2683-2694.
182. Nierenberg, J.L., et al., *Whole exome sequencing and replication for breast cancer among Hispanic/Latino women identifies FANCM as a susceptibility gene for estrogen-receptor-negative breast cancer*. medRxiv, 2023.
183. Roberts, N.J., et al., *Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer*. Cancer Discov, 2016. **6**(2): p. 166-75.
184. Tung, N., et al., *Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations*. Nat Rev Clin Oncol, 2016. **13**(9): p. 581-8.
185. Li, H., et al., *Risks of breast and ovarian cancer for women harboring pathogenic missense variants in BRCA1 and BRCA2 compared with those harboring protein truncating variants*. Genet Med, 2022. **24**(1): p. 119-129.
186. Boonen, R., M.P.G. Vreeswijk, and H. van Attikum, *CHEK2 variants: linking functional impact to cancer risk*. Trends Cancer, 2022. **8**(9): p. 759-770.
187. Young, E.L., et al., *Multigene testing of moderate-risk genes: be mindful of the missense*. J Med Genet, 2016. **53**(6): p. 366-76.
188. Spurdle, A.B., et al., *ENIGMA--evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in BRCA1 and BRCA2 genes*. Hum Mutat, 2012. **33**(1): p. 2-7.
189. Kleiblova, P., et al., *Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer*. Int J Cancer, 2019. **145**(7): p. 1782-1797.
190. Murray, M.L., et al., *Follow-up of carriers of BRCA1 and BRCA2 variants of unknown significance: variant reclassification and surgical decisions*. Genet Med, 2011. **13**(12): p. 998-1005.
191. Eccles, B.K., et al., *Understanding of BRCA VUS genetic results by breast cancer specialists*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 936.

192. Carlsson, L., et al., *Psychological distress following multi-gene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer risk*. J Genet Couns, 2025. **34**(2): p. e1940.
193. Kelly, P., S. Mahon, and P. Friend, *When Germline Genetic Testing Results Are Unclear: Highlighting Variants of Uncertain Significance*. J Adv Pract Oncol, 2023. **14**(7): p. 631-638.
194. Stradella, A., et al., *Response to letter entitled: Re: ERCC3 a new ovarian cancer susceptibility gene?* Eur J Cancer, 2021. **150**: p. 281-282.
195. Stradella, A., et al., *ERCC3, a new ovarian cancer susceptibility gene?* Eur J Cancer, 2020. **141**: p. 1-8.
196. Soukupova, J., et al., *Re: ERCC3, a new ovarian cancer susceptibility gene?* Eur J Cancer, 2021. **150**: p. 278-280.
197. Steffen, J., et al., *Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland*. Int J Cancer, 2006. **119**(2): p. 472-5.
198. Mateju, M., et al., *Germline mutations 657del5 and 643C>T (R215W) in NBN are not likely to be associated with increased risk of breast cancer in Czech women*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(2): p. 809-11.
199. Zeng, C., et al., *Evaluation of pathogenetic mutations in breast cancer predisposition genes in population-based studies conducted among Chinese women*. Breast Cancer Res Treat, 2020. **181**(2): p. 465-473.
200. Aloraifi, F., et al., *Protein-truncating variants in moderate-risk breast cancer susceptibility genes: a meta-analysis of high-risk case-control screening studies*. Cancer Genet, 2015. **208**(9): p. 455-63.
201. Elkholi, I.E., et al., *Investigating the causal role of MRE11A p.E506* in breast and ovarian cancer*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 2409.
202. Niu, Y., et al., *Multiparametric and accurate functional analysis of genetic sequence variants using CRISPR-Select*. Nat Genet, 2022. **54**(12): p. 1983-1993.

8. Přílohy (práce *in extenso*)

Příloha 1: Horackova K, Frankova S, Zemankova P, Nehasil P, Cerna M, Neroldova M, **Otahalova B**, Kral J, Hovhannisyan M, Stranecky V, Zima T, Safarikova M, Kalousova M, 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*. 2023; 15(1):201. (IF₂₀₂₃=4,5)

Příloha 2: Hovhannisyan M, Zemankova P, Nehasil P, Matejkova K, Borecka M, Cerna M, Dolezalova T, Dvorakova L, Foretova L, Horackova K, Jelinkova S, Just P, Kalousova M, Kral J, Machackova E, Nemcova B, Safarikova M, Springer D, **Stastna B**, Tavandzis S, Vocka M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Ernst C, Kleibl Z, Janatova M. **Population-specific validation and comparison of the performance of 77- and 313-variant polygenic risk scores for breast cancer risk prediction.** *Cancer*. 2024 May 8 (IF₂₀₂₃=6,1)

Příloha 3: Horackova K, Zemankova P, Nehasil P, Vocka M, Hovhannisyan M, Matejkova K, Janatova M, Cerna M, Kleiblova P, Jelinkova S, **Stastna B**, Just P, Dolezalova T, Nemcova B, Urbanova M, Koudova M, Hazova J, Machackova E, Foretova L, Stranecky V, Zikan M, Kleibl Z, Soukupova J. **A comprehensive analysis of germline predisposition to early-onset ovarian cancer.** *Sci Rep*. 2024 Jul 13; 14(1):16183 (IF₂₀₂₃=3,8)

Příloha 4: Kral J, Jelinkova S, Zemankova P, Vocka M, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Dostalek L, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Chvojka S, Kalousova M, Kosarova M, Koudova M, Krutikova 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. 25(6): 216. (IF₂₀₂₃=2,5)

Příloha 5: Janatová M, Borecká M, Zemánková P, Matějková K, Nehasil P, Černá L, Černá M, Dušková P, Doležalová T, Foretová L, Havránek O, Házová J, Horáčková K, Hovhannisyan M, Hrušková L, Chvojka Š, Janíková M, Kalousová M, Kosařová M, Koudová M, Krhutová V, Krulišová V, Macháček E, Michalovská R, Němcová B, Novotný J, Šafaříková M, **Šťastná B**, Stránecký V, Šubrt I, Tavandzis S, Vlčková Z, Vočka M, Vrtěl R, Zima T, Soukupová J, Kleiblová P, Kleibl Z. **Genetic Predisposition to Male Breast Cancer.** *Folia Biol (Praha)*. 2024; 70(5-6):274-284. (IF₂₀₂₃=1,1)

Příloha 6: **Otahalova B**, Volkova Z, Soukupova J, Kleiblova P, Janatova M, Vocka M, Macurek L, Kleibl Z. **Importance of Germline and Somatic Alterations in Human MRE11, RAD50, and NBN Genes Coding for MRN Complex.** *Int J Mol Sci*. 2023; 24(6):5612. (IF₂₀₂₂=4,9)

Příloha 7: **Stastna B**, Dolezalova T, Matejkova K, Nemcova B, Zemankova P, Janatova M, Kleiblova P, Soukupova J, Kleibl Z. **Germline pathogenic variants in the MRE11, RAD50, and NBN (MRN) genes in cancer predisposition: A systematic review and meta-analysis.** *Int J Cancer*. 2024 Jun 26. (IF₂₀₂₃=5,7)

Příloha 8: Kleiblova P, Cerna M, Zemankova P, Matejkova K, Nehasil P, Hojny J, Horackova K, Janatova M, Soukupova J, **Stastna B**, Kleibl Z. **Parallel DNA/RNA NGS using identical target enrichment panel in the analysis of hereditary cancer predisposition.** *Folia Biol (Praha)*. 2024; 70: 62-73. (IF₂₀₂₃=1,1)

Příloha 9: Cerna M*, **Stastna B***, Pesek P, Dolezalova T, Janatova M, Soukupova J, Horackova K, Kleiblova P. **Semi-automated RNA isolation from Tempus Blood RNA tubes using the MagCore Plus II instrument.** *Folia Biol (Praha)* 2025; *accepted*. (IF₂₀₂₃=1,1)

* sdílené první autorství

Příloha 10: Zemankova P, Cerna M, Horackova K, Ernst C, Soukupova J, Borecka M, Blümcke B, Cerna L, Cerna M, Curtisova V, Dolezalova T, Duskova P, Dvorakova L, Foretova L, Havranek O, Hauke J, Hahnen E, Hodulova M, Hovhannisyan M, Hruskova L, Janatova M, Janikova M, Jelinkova S, Just P, Kosarova M, Koudova M, Krutilkova V, Machackova E, Matejkova K, Michalovska R, Misove A, Nehasil P, Nemcova B, Novotny J, Panczak A, Pesek P, Scheinost O, Springer D, **Stastna B**, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Tureckova E, Vesela K, Vlckova Z, Vocka M, Wappenschmidt B, Zima T, Kleibl Z, Kleiblova P. **A deep intronic recurrent *CHEK2* variant c.1009-118_1009-87delinsC affects pre-mRNA splicing and contributes to hereditary breast cancer predisposition.** *Breast.* 2024 Mar 25; 75:103721. (IF₂₀₂₃=5,7)

Příloha 11: Soukupova J*, **Stastna B***, Kanwal M, Hojny J, Zemankova P, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Cerna M, Curtisova V, Dolezalova T, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Hruskova L, Chvojka S, Janatova M, Janikova M, Jelinkova S, Just P, Kalousova M, Kleiblova P, Kosarova M, Koudova M, Kral J, Krausova M, Krutilkova V, Machackova E, Matejkova K, Michalovska R, Nehasil P, Nemcova B, Novotny J, Palek M, Pesek P, Safarikova M, Scheinost O, Springer D, Stolarova L, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Tureckova E, Vesela K, Vlckova Z, Vocka M, Zima T, Macurek L, Kleibl Z, CZEKANCA consortium. **A comprehensive study evaluating germline *FANCG* variants in predisposition to breast and ovarian cancer.** *Cancer Med.* 2024 Aug; 13(16):e70103. (IF₂₀₂₃=2,9).
* sdílené první autorství

Příloha 12: Stolarova L, Kleiblova P, Zemankova P, **Stastna B**, Janatova M, Soukupova J, Achatz MI, Ambrosone C, Apostolou P, Arun BK, Auer P, Barnard M, Bertelsen B; Biobank Japan; Blok MJ, Boddicker N, Brunet J, Burnside ES, Calvello M, Campbell I, Chan SH, Chen F, Chiang JB, Coppa A, Cortesi L, Crujeiras-González A; Consortium CZEKANCA; De Leeneer K, De Putter R, DePersia A, Devereux L, Domchek S, Efremidis A, Engel C, Ernst C, Evans DGR, Feliubadaló L, Fostira F, Fuentes-Ríos O, Gómez-García EB, González S, Haiman C, Hansen TVO, Hauke J, Hodge J, Hu C, Huang H, Ishak NDB, Iwasaki Y, Konstantopoulou I, Kraft P, Lacey J, Lázaro C, Li N, Lim WK, Lindstrom S, Lori A, Martinez E, Martins A, Matsuda K, Matullo G, McInerney S, Michailidou K, Montagna M, Monteiro ANA, Mori L, Nathanson K, Neuhausen SL, Nevanlinna H, Olson JE, Palmer J, Pasini B, Patel A, Piane M, Poppe B, Radice P, Renieri A, Resta N, Richardson ME, Rosseel T, Ruddy KJ, Santamariña M, Dos Santos ES, Teras L, Toland AE, Trentham-Dietz A, Vachon CM, Volk AE, Weber-Lassalle N, Weitzel JN, Wiesmuller L, Winham S, Yadav S, Yannoukakos D, Yao S, Zampiga V, Zethoven M, Zhang ZW, Zima T, Spurdle AB, Vega A, Rossing M, Del Valle J, De Nicolo A, Hahnen E, Claes KBM, Ngeow J, Momozawa Y, James PA, Couch FJ, Macurek L, Kleibl Z. **ENIGMA *CHEK2* project: a comprehensive study identifies functionally-impaired *CHEK2* germline missense variants associated with increased breast cancer risk.** *Clin Cancer Res.* 2023 Aug 15; 29(16):3037-3050. (IF₂₀₂₃=10,0)