Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Analýza hereditárních genetických variant predisponujících ke vzniku familiární formy karcinomu ovaria

Mgr. Klára Lhotová

2020

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie (YMBG)

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školicí pracoviště: Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. lékařská fakulta UK v Praze

Školitel: RNDr. Jana Soukupová Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

OBSAH ... 3
ÚVOD ... 6
Histolopatologická klasifikace ... 6
Stádium onemocnění ... 6
Dědičná predispozice ke karcinomu ovaria ... 6
CÍL PRÁCE ... 7
METODY ... 7
Soubor testovaných osob ... 7
Příprava sekvenační knihovny a sekvenace ... 8
Bioinformatická analýza ... 8
Klasifikace variant ... 8
Statistická analýza ... 9
VÝSLEDKY ... 9
Charakterizace pacientek s karcinomem ovaria ... 9
Mutace v 18 genech predisponujících k syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria ... 9
Charakteristika nosičů mutace ve vztahu k věku v době diagnózy ... 10
Charakteristika nosičů mutace ve vztahu k osobní a rodinné nádorové anamnéze ... 10
Charakteristika nosičů mutace vzhledem ke stádiu a histologii onemocnění ... 11
Mutace v dalších 201 analyzovaných genech ... 11
DISKUZE ... 11
ZÁVĚR ... 14
CITACE ... 15
SEZNAM PUBLIKACÍ ... 18

ABSTRAKT

Karcinom ovaria (OC) je závažné nádorové onemocnění s velkým podílem hereditárních forem a častou asociací s karcinomem prsu. Genetické testování umožňuje vytvoření preventivních programů pro nosičky mutací v genech predisponujících ke vzniku karcinomu ovaria a případně dalších malignit. Prevalence dědičných mutací se v jednotlivých predispozičních genech mezi populacemi často liší.
V této studii jsme analyzovali 1333 pacientek s karcinomem ovaria a 2278 populačně-specifických kontrol (PSK) pomocí sekvenování nové generace s využitím panelu CZECANCA cílícího na 219 genů. Dohromady byla nalezena patogenní mutace v některém z 18 genů predisponujících k dědičnému karcinomu prsu a/nebo ovaria u 427/1333 (32,0%) OC pacientek a 58/2278 (2,5%) PSK. S vysokým rizikem vzniku karcinomu ovaria (OR>5) byly asociovány mutace v genech *BRCA1, BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1* a v genech účastnících se opravy DNA mechanismem nesprávně spárovaných bazí (MMR). Mutace v genech *BRIP1* a *NBN* byly asociovány se středním rizikem vzniku karcinomu ovaria (OR ≥2-<5). Mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* byly nejčastější téměř ve všech klinicko-patologických podskupinách, včetně borderline nádorů s nejasným maligním potenciálem (BTO). V rámci dalších 201 analyzovaných genů byly alespoň se středním rizikem vzniku karcinomu ovaria asociovány mutace v genech *PPM1D* (ve formě mozaiky), *SHPRH* a *NAT1.* K upřesnění významu mutací v těchto genech jsou však s ohledem na jejich nízkou četnost potřeba další studie na větších souborech a v dalších populacích.
Tato studie poukazuje na vysoký podíl pacientek s dědičnou formou OC ve slovanské populaci, který odůvodňuje genetické testování u všech pacientek s OC, včetně BTO.

SUMMARY

Ovarian cancer (OC) is the deadliest gynecologic malignancy with a substantial proportion of hereditary cases and a frequent association with breast cancer (BC). Genetic testing facilitates preventive management for carriers of mutations in OC-susceptibility genes. However, the prevalence of germline mutations varies among populations and many rarely mutated OC predisposition genes remain to be identified.

We analyzed 219 genes in 1333 Czech OC patients and 2278 population-matched controls (PMC) using next-generation sequencing. Altogether, 427/1333 (32%) patients and 58 /2278 (2,5%) PMC carried pathogenic mutations in 18 known/anticipated OC predisposition genes. Mutations in *BRCA1, BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1* and mismatch repair genes conferred a high OC risk (with OR>5). Mutations in *BRIP1* and *NBN* were associated with moderate risk (both OR ≥2 - <5). *BRCA1/2* mutations dominated in almost all clinicopathological subgroups including sporadic borderline tumors of ovary (BTO). Analysis of remaining 201 genes revealed somatic mosaics in *PPM1D* and germline mutations in *SHPRH* and *NAT1* associating with a high/moderate OC risk significantly; however, further studies are warranted to delineate their contribution to OC development in other populations.

Results of this study demonstrate the high proportion of patients with hereditary OC in Slavic population justifying genetic testing in all patients with OC, including BTO.

ÚVOD

Karcinom ovaria je pátým nejčastějším nádorovým onemocněním žen celosvětově (Ferlay, Parkin, and Steliarova-Foucher 2010, Goodman et al. 2003), přičemž incidence a mortalita se v čase výrazně nemění. V České republice bylo v roce 2017 diagnostikováno 982 nových případů, z nichž 641 skončilo úmrtím (www.svod.cz). Přibližně u dvou třetin pacientek je onemocnění diagnostikováno v pokročilém stádiu, což do určité míry vysvětluje jeho vysokou mortalitu, nejvyšší v rámci gynekologických malignit (Ferlay, Parkin, and Steliarova-Foucher 2010). Pozdní diagnóza, která je spojená se špatnou prognózou, je způsobena především asymptomatickým začátkem onemocnění a omezenými diagnostickými možnostmi.

Histolopatologická klasifikace

Maligní ovariální nádory představují asi 30% maligních nádorů vznikajících v oblasti vnitřního genitálu a jsou druhou nejčastější skupinou po nádorech děložního těla. Jedná se o heterogenní onemocnění. Přibližně 90% nádorů je odvozených od epiteliálních buněk a pouze malá část nádorů pochází z germinálních buněk či buněk stromatu a zárodečných pruhů (Prat 2014). Dualistický model ovariální karcinogeneze dělí epiteliální karcinomy ovaria do dvou skupin skupin, typ I a typ II. Karcinomy typu I zahrnují karcinomy endometroidní, světlobuněčné, LG serózní a mucinózní. Seromucinózní karcinomy a maligní Brennerovy nádory jsou vzácné. Seromucinózní karcinomy se označují také jako smíšené Müllerovy nádory. Karcinomy typu II jsou nejčastější HG serózní karcinomy a mnohem vzácnější karcinosarkomy a nediferencované karcinomy. Nádory I. typu jsou méně časté, vznikají z prekurzorové léze a jsou charakterizovány pomalejší progresí a vyšším pětiletým přežitím. Karcinomy II. typu vznikají na rozdíl od I. typu rychle jsou obvykle diagnostikovány v pozdějších stádiích, tvoří většinu případu diagnostikovaných karcinomů ovaria a mají horší prognózu (Bouda J 2018).

Stádium onemocnění

Rozsah onemocnění je klasifikován pomocí AJCC (American Joint Committee on Cancer) TNM staging a FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) systému klasifikace, přičemž oba typy klasifikace jsou obdobné. FIGO je založen na chirurgickém stagingu, přičemž TNM je založen na klinické a/nebo patologické klasifikaci. Prognóza onemocnění závisí na mnoha faktorech, které ovlivňují výběr léčebného postupu a mezi které patří klinické stadium, histologický typ, grading, operační nález a pooperační reziduum.

Dědičná predispozice ke karcinomu ovaria

Většina nádorových onemocnění je sporadických a přibližně 5-10% vzniká na základě dědičné predispozice (Nagy, Sweet, and Eng 2004). U karcinomů ovaria je zastoupení dědičných forem onemocnění vyšší a v naší populaci dosahuje až 30% všech případů (Lhotova et al. 2020).
Celoživotní riziko rozvoje karcinomu ovaria v běžné populaci se pohybuje pod 2% (Masarykův onkologický ústav 2019), avšak u žen s mutací v některém s predispozičních genů může být celoživotní riziko vzniku onemocnění velmi vysoké. Spolu s faktem, že diagnostika časných stádií onemocnění je velmi obtížná, je nutné identifikovat ženy s vysokým či významně zvýšeným rizikem onemocnění. Dle relativního rizika (RR) vzniku onemocnění pro nosičky patogenních mutací dělíme predispoziční geny na geny vysokého rizika (RR ≥5), středního rizika (RR ≥ 2 - <5) či nezvýšeného/mírně zvýšeného rizika (RR <2) (Gronwald et al. 2019). Ženám s výrazně zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria lze

nabídnout preventivní riziko-redukující salpingooforektomii (RRSO), genetické poradenství včetně preimplantační diagnostiky či sledování ve smyslu včasného zachycení možných dalších malignit asociovaných s mutacemi v příslušných predispozičních genech.
Příchod sekvenování nové generace (next generation sequencing; NGS) a jeho zavedení do rutinní praxe umožnilo testování mnoha nádorových predispozičních genů u velkého počtu pacientů při rozumných ekonomických nákladech v porovnání s klasickou „gene-by-gene“ analýzou (Walsh et al. 2011). Zároveň tento nový přístup vedl k identifikaci dalších genů a jejich alterací asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění.
Karcinom ovaria je součástí syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria, který se v postižených rodinách může kromě karcinomu prsu a ovaria manifestovat výskytem i dalších nádorů jako je karcinom slinivky a prostaty u mužů. . Tuto skutečnost reflektují i aktuální národní indikační kritéria pro testování dědičné formy nádorů prsu a ovarií (modifikovaná dle doporučení NCCN, National Comprehensive Cancer Network (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf)) schválená 2019 Společností lékařské genetiky. Podle aktuálního doporučení NCCN (High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, verze 1.2020 ze 4.12.2019) můžeme predispoziční geny prokazatelně asociované se syndromem dědičného karcinomu prsu a/nebo ovaria rozdělit (s ohledem na riziko čistě ovariálního karcinomu) na geny s prokázaným zvýšením rizika, možným zvýšením rizika a nezvýšeným rizikem vzniku tohoto onemocnění (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf). Prokazatelně zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria je spojeno s mutacemi v genech *BRCA1, BRCA2, RAD51C, RAD51D, BRIP1, MLH1, MSH2, MSH6, STK11*. Možné zvýšení rizika vzniku karcinomu ovaria je uvažováno pro nosičky mutací v genech *NBN, PALB2, ATM, BARD1*. Pro nosičky mutací v dalších genech pro syndrom dědičného karcinomu prsu a ovaria (*CHEK2, TP53,CDH1, PTEN, NF1*) není dle aktuálních NCCN doporučení riziko vzniku karcinomu ovaria zvýšeno či pro něj není dostatek dat.

CÍL PRÁCE

Práce si kladla za cíl určit frekvenci výskytu patogenních mutací v nádorových predispozičních genech u pacientek s karcinomem ovaria v naší populaci, charakterizovat klinicko-patologické vlastnosti u pacientek s karcinomem ovaria, jež jsou nosičkami mutací v genech se známou/předpokládanou predispozicí ke vzniku karcinomu ovaria a identifikovat varianty v kandidátních genech, které by mohly být asociovány se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria.

METODY

Soubor testovaných osob

Celkem bylo panelovým sekvenováním (panel CZECANCA - CZEch CAncer paNel for Clinical Application) vyšetřeno 1333 pacientek s diagnózou karcinomu ovaria. Mezi pacientky byly zahrnuty ženy s karcinomem ovaria diagnostikovaným v letech 2010-2018. Klinicko-patologická data byla shromážděna během genetické konzultace nebo získána ze zdravotní dokumentace pacientek. Pacientky s karcinomem ovaria a pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou byly rozděleny do skupin: i) s výskytem pouze karcinomu ovaria v rodině (HOC); ii) s výskytem karcinomu prsu a/nebo ovaria v

rodině (HBOC); iii) s výskytem jiných nádorových onemocnění v rodině (multinádorové rodiny) a iv) bez výskytu nádorového onemocnění v rodině.
Studie analyzovala také 2278 populačně specifických kontrol, z nichž 616 bylo nenádorových kontrol a 1662 neselektovaných kontrol. Populace nenádorových kontrol byla reprezentována dobrovolníky (78 mužů a 538 žen) nad 60 let včetně, bez pozitivní osobní a rodinné nádorové anamnézy u příbuzných prvního stupně, kteří byli vyšetřeni panelovým sekvenováním (panelem CZECANCA). Populace neselektovaných kontrol byla reprezentována 1170 muži a 492 ženami s mediánem věku 57 let (18-88 let), kteří byli analyzováni Národním centrem pro lékařskou genomiku (http://ncmg.cz) exomovým sekvenováním z jiných důvodů než nádorové onemocnění.

Příprava sekvenační knihovny a sekvenace

K sekvenování byl použit panel CZECANCA, který byl navržen na našem pracovišti pomocí softwaru NimbleDesign (NimbleGen SeqCap EZ Choice, Roche). Tento panel specificky cílí na nádorové predispoziční geny se známou asociací ke vzniku nejčastějších dědičných nádorových syndromů (hereditárního karcinomu prsu, ovaria, kolorekta, pankreatu, žaludku, endometria, ledvin, prostaty a kůže), další DNA reparační geny a geny s možnou asociací s nádorovým onemocněním identifikované v předcházející studii (Lhota et al. 2016). Oblast zájmu zahrnuje exony výše uvedených genů s přesahem 10pb do intronů a promotory vybraných genů (Soukupova et al. 2018).
Přípravu vzorku lze rozdělit do několika základních fází. První fáze je náhodnou fragmentací genomové DNA. Fragmentace preferenčně probíhala pomocí ultrazvukového štěpení na sonikátoru Covaris E220 (Covaris Inc) v nastavení optimalizovaném pro získání fragmentů o velikosti 200 bp. Jako alternativní způsob štěpení byla využita enzymatická fragmentace s použitím fragmentázy. Následovala ligace adaptorů a vytvoření DNA knihovny, dále nabohacení sekvenační knihovny o vybrané oblasti genomu (enrichment) a výsledná knihovna byla denaturována a sekvenována. V naší práci jsme k sekvenování využívali platformu Miseq (Illumina), která využívá syntézu reverzního vlákna s reverzibilně terminačními nukleotidy s navázanou fluorescenční značkou.

Bioinformatická analýza

Detekce jednonukleotidových variant - SNVs (single nucleotide variants) a malých insercí a delecí (INDELS) z hrubých dat může být rozděleno na 3 části: 1. Alignment- mapování na referenční genom, 2. Variant calling (genotypování) – identifikování oblastí, které vykazují odlišnost oproti referenčnímu genomu, 3. Filtrace variant a anotace – filtrace vybraných odlišností/variant na základě kvality sekvenování a přiřazení biologické funkce dané variantě. Středně dlouhé inzerce a tandemové duplikace (přesahující přibližně polovinu sekvenačního čtení) byly hodnoceny pomocí nástroje Pindel s využitím hodnocení soft-klipových bází. Pro analýzu velkých genomových přestaveb byl využit upravený nástroj CNVkit, který vychází z pokrytí daného úseku. Hodnoty CNV skóre byly normalizovány. Pokrytí vybraných cílových oblastí bylo vizualizováno pomocí *in-house* nástroje pro každý vzorek (R, Petra Zemánková). Hranice minimálního pokrytí pro spolehlivou identifikaci SNV byla 20X.

Klasifikace variant

Nejprve jsme analyzovali 18 genů klinicky relevantních k HBOC syndromu dle NCCN a to: *ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53.* Nalezené varianty s frekvencí ≤0,01 v projektu 1000 Genomes a ≤0,05 v nenádorových kontrolách byly rozděleny do 3 skupin: 1) patogenní / pravděpodobně patogenní

varianty, 2) varianty nejasného významu (Variants of unknown/uncertain significance; VUS) a 3) benigní / pravděpodobně benigní varianty. Klasifikace vycházela z doporučení ENIGMA konsorcia (https://enigmaconsortium.org). Všechny nonsence, posunové a sestřihové (±1-2bp) mutace spolu s rozsáhlými delecemi či inzercemi (copy number variation; CNV) byly považovány za patogenní/pravděpodobně patogenní, pokud nebyly klasifikovány jinak dle ClinVar databáze. Duplikace celého genu byly považovány za varianty nejasného významu. Ostatní typy mutací byly považovány za patogenní či pravděpodobně patogenní, pokud tak byly hodnoceny alespoň dvěma pracovišti v databázi ClinVar. Varianty nejasného významu v genu *TP53* byly hodnoceny dle databáze IARC TP53 (http://p53.iarc.fr/). Hodnocení variant nejasného významu v genu *CHEK2* vycházelo z funkční analýzy (Kleiblova et al. 2019).
Následně jsme hodnotili varianty v dalších 201 genech analyzovaných panelem CZECANCA. Nonsence, posunové a sestřihové (±1-2bp) mutace spolu se CNV (mimo duplikací celého genu) s frekvencí ≤0,01 v projektu 1000 Genomes a ≤0,05 v nenádorových kontrolách byly hodnoceny jako patogenní.
Všechny patogenní/pravděpodobně patogenní varianty byly potvrzeny Sangerovým sekvenováním a CNV pomocí MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) nebo qPCR, pokud nebyla MLPA k dispozici.

Statistická analýza

OR bylo pro vybrané geny spočítáno pomocí Fisherova statistického testu a za signifikantní byla považována hodnota $p < 0,05$. Pacientky, u kterých byly nalezeny dvě a více patogenních mutací byly vyřazeny z analýzy OR. Pro identifikaci dalších potenciálních genů, které by mohly být asociovány s rizikem vzniku karcinomu ovaria, byla použita Bonferroniho korekce. Asociace mutace s klinicko-patologickou charakteristikou byla testována pomocí Fisherova testu a *p* hodnoty menší než 0,05 byl považovány na signifikantní.

VÝSLEDKY

Charakterizace pacientek s karcinomem ovaria

Skupina pacientek zahrnovala 1045 (78,4%) pacientek pouze s karcinomem ovaria (OC) a 288 pacientek s nádorovou duplicitou, z nichž u 210 byl diagnostikován karcinomu prsu a ovaria (15,8%) a u 78 karcinom ovaria a jiný tumor (5,9%). Průměrný věk v době diagnózy byl 53,7 let (15-86 let) a téměř polovina (47,6%) pacientek měla negativní rodinnou nádorovou anamnézu. U 65% (728/1120) pacientek s dostupnou informací o histologickém typu nádoru byl identifikován serózní adenokarcinom, nejčastěji HG serózní. Téměř u dvou třetin pacientek byl nádor identifikován v pokročilém stádiu (III/IV).

Mutace v 18 genech predisponujících k syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria

Nejčastěji mutovanými geny byly hlavní predispoziční geny *BRCA1* a *BRCA2* (323/1320; 24,5% pacientek). U populačně-specifických kontrol jsme nalezli mutace v *BRCA1/2* u 12/2278 jedinců (0,5%). Více než třetinu všech mutací v *BRCA1/2* (114/323; 35,9%) u pacientek představovaly tři zakladatelské („founder“) mutace v *BRCA1* c.5266dupC, c.3700_3704delGTAAA a c.181 T >G.

U 65/1320 (4,9%) pacientek s karcinomem ovaria a 19/2278 kontrol (0,8%) byla nalezena mutace v jednom z dalších 8 genů signifikantně asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria. Velké genomové přestavby představovaly 8,4% (37/441) ze všech patogenních mutací a byly nalezeny v sedmi genech: *BRCA1* (23×), *BRIP1* (4×), *CHEK2* (4×), *MLH1* (2×), *STK11* (2×), *PALB2* (1×) a *CDH1* (1×) u 37/1333 (2,8%) pacientek. U kontrolní skupiny jsme při CNV analýze 18 uvedených genů nalezli pouze jednu duplikaci postihující celý gen *MSH6*, kterou jsme klasifikovali jako variantu nejasného významu.

Charakteristika nosičů mutace ve vztahu k věku v době diagnózy

Nejvyšší frekvence mutací byla zachycena u pacientek, kterým byl diagnostikován karcinom ovaria ve věku 40-49 let (37,4%) a 50-59 let (40,7%). Naopak nejnižší frekvence byla u pacientek, u kterých byla diagnóza stanovena před 30. rokem života (8,3%). Ve frekvenci mutací v genech asociovaných s karcinomem ovaria jsme pozorovali významný rozdíl mezi nejstarší (70 a více let) a nejmladší (méně než 30 let) skupinou pacientek (27/94;28,7% vs. 13/84; 15,5%; p=0,013). Průměrný věk v době diagnózy se lišil u nosiček mutace v genu *BRCA1* (medián 51,0 let, v rozmezí 23-78 let) a u nosiček mutace v genu *BRCA2* (medián 58,4 let, v rozmezí 27,78 let, $p=8{,}5\times10^{-10}$). V ostatních genech, ve kterých byly zachyceny mutace u nejméně 10 pacientek, stoupal průměrný věk v době diagnózy u nosiček mutací v genu *RAD51C* (medián 52,2 let; v rozmezí 25-69 let), *NBN* (medián 54,5 let; v rozmezí 18-76 let), *RAD51D* (medián 56,0 let; v rozmezí 36-69 let) k *BRIP1* (medián 58,0 let; v rozmezí 30-71 let). Průměrný věk v době diagnózy pro nosičky mutace v MMR genech asociovaných s Lynchovým syndromem byl 46,0 let (v rozmezí 35-73 let). Pro *MSH6* byl průměrný věk pacientek v době diagnózy 51,0 let (v rozmezí 35-73 let), zatímco pro *MLH1*/*MSH2* byl 44,1 let (v rozmezí 37-61 let).

Charakteristika nosičů mutace ve vztahu k osobní a rodinné nádorové anamnéze

Nejvyšší četnost mutací jsme zachytili u pacientek s nádorovou duplicitou karcinomu prsu a ovaria (109/203; 53,7%). U pacientek pouze s karcinomem ovaria byl záchyt mutací 24,7% (256/1038), podobnou frekvenci mutací jsme našli také u pacientek s diagnostikovaným karcinomem ovaria a dalším nádorovým onemocněním mimo karcinom prsu (21/79; 26,6%).

Nejčastěji byly nalezeny mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*. Nejvyšší frekvence *BRCA1/2* mutací jsme nalezli u pacientek s duplicitním onemocněním karcinomu prsu a ovaria (49,8%; 101/203). U pacientek pouze s karcinomem ovaria (20,1%; 209/1038) či s duplicitou karcinomu ovaria a jiného nádorového onemocnění (16,5%; 13/79) byla frekvence mutací v hlavních predispozičních genech výrazně nižší. Zatímco u pacientek s duplicitním nádorovým onemocněním karcinomu ovaria a dalšího nádoru mimo karcinom prsu a mutací v MMR genech byl vedle karcinomu ovaria typicky diagnostikován karcinom kolorekta a endometria, u nosiček mutací v *BRCA1/2* ze stejné skupiny pacientek byla diagnostikována řada nádorů (nádory štítné žlázy, děložního čípku, močového měchýře, plic, pobřišnice, endometria či po melanomy i nemelanomové nádory kůže).

Frekvence mutací u pacientek z rodin s dědičným výskytem karcinomu ovaria byla 49,1%. Nižší frekvenci mutací jsme zachytili v rodinách s výskytem karcinomu prsu a ovaria (41,0%) a v rodinách s vícečetným výskytem dalších nádorů (MCF, Multicancer families)(29,4%). Nejnižší, přesto však významnou frekvenci mutací v 10 genech predisponujících ke karcinomu ovaria jsme identifikovali u pacientek bez pozitivní rodinné nádorové anamnézy (20,4%; 120/587), u kterých jsme zachytili téměř třetinu všech mutací (30,9%; 120/338). Patogenní mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* jsme nalezli u 45,7% (53/116) u pacientek z HOC rodin, 37,5% (127/339) pacientek z HBOC rodin, 26,1% (47/180) pacientek z MCF rodin a u 14,5% (85/587) pacientek bez rodinné nádorové historie.

Charakteristika nosičů mutace vzhledem ke stádiu a histologii onemocnění

Téměř u 60% pacientek byl karcinom ovaria diagnostikován ve stádiu III a IV dle FIGO klasifikace. Nosičky patogenních mutací v jednotlivých stádiích onemocnění tvořily přibližně třetinu pacientek (31,4% ve stádiu II; 35,8% ve stádiu III; 33,0% ve stádiu IV) s výjimkou žen s karcinomem ovaria ve stádiu I (18,1%). Je zajímavé, že u šesti z osmi pacientek s mutací v MMR genu (Lynchův syndrom) bylo onemocnění diagnostikováno ve stádiu I.

Podle frekvence mutací jsme mohli rozdělit histologické typy karcinomů ovaria do 2 skupin: podskupinu nádorů s vysokou frekvencí mutací (34,5%; 303/879 pacientek)-HG/nespecifikované serózní, borderline a endometroidní nádory, zatímco do podskupiny s nízkou frekvencí mutací (12,1%; 28/232) spadaly LG serózní, mucinózní, světlobuněčné a další vzácné histologické typy nádorů ovaria. Frekvence mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* byla u pacientek s HG serózním karcinomem ovaria více než dvakrát vyšší (30,9%; 146/472) než u pacientek s LG serózním histologickým typem nádoru (13,1%; 11/84). Distribuce mutací v genech *BRIP1/RAD51C/RAD51D* napříč histologickými typy byla podobná jako u mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Nejnižší frekvence mutací (7,8%; 7/90) jsme nalezli i pacientek se vzácnými histologickými typy nádorů ovaria.

Mutace v dalších 201 analyzovaných genech

V další fázi této práce jsme hodnotili dalších 201 genů analyzovaných panelem CZECANCA. V těchto genech jsme nalezli 230 mutací v 89 genech u 208 pacientek (15,6%), přičemž 149 pacientek (11,2%) neslo mutaci pouze v některém z těchto 201 genů a 59 pacientek (4,4%) neslo zároveň mutaci i v jednom z 10 genů asociovaných s karcinomem ovaria. Mutace v 201 genech byly vzácné. Vyšší prevalence mutací u pacientek v porovnání s populačně specifickými kontrolami jsme pozorovali u genů *PPM1D, NAT1* a *SHPRH*.

Po Bonferroniho korekci u pacientek bez zárodečné mutace v některém z genů asociovaných s karcinomem ovaria byly s karcinomem ovaria statisticky významně (p=0,003) asociovány pouze mutace v genu *PPM1D*. Všechny mutace v genu *PPM1D* byly přítomny ve formě mozaiky s minoritní alelickou frekvencí (MAF) od 14% do 60% u pacientek a od 17% do 19% u kontrol). Sedm z 15 nosiček mutace v genu *PPM1D* neslo zároveň mutaci v některém z DNA reparačních genů (3×*BRCA2*, 1×*PALB2*, 1×*EXO1* a 1×*PMS1*). Mutace v genech *PPM1D* a *SHPRH* byly statisticky významně asociovány s věkem v době diagnózy >60 let (p=0,001). Frekvence mutací v genu *NAT1* byla v jednotlivých klinicko-patologických kategoriích podobná.

DISKUZE

Naše práce zabývající se genetickou predispozicí ke karcinomu ovaria představuje s analýzou 1333 pacientek s karcinomem ovaria a 2278 populačních kontrol dosud největší studii české i slovanské populace. V první fázi jsme se zaměřili na hodnocení patogenních variant v 18 genech uvedených v současných doporučeních NCCN jako geny asociované s vysokým/zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria. Z těchto 18 predispozičních genů jsme prokázali statisticky významně zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria pro nosičky zárodečných patogenních mutací v 10 predispozičních genech. Patogenní mutace v některém z těchto 10 genů byla nalezena u 29,9% (399/1333) pacientek a 1,4% (31/2278) populačních kontrol. Mutace v ostatních osmi genech buď nebyly zachyceny vůbec (*CDKN2A* a *NF1*) či velmi vzácně (*CDH1*, *PTEN*, *STK11* a *TP53*) nebo se frekvence výskytu jejich mutací ve skupině pacientek kontrol významně nelišila (*ATM*, *PALB2*). Mutace v genech *BRCA1/2, RAD51C/D* a genech Lynchova syndromu byly spojeny s vysokým rizikem vzniku

karcinomu ovaria a mutace v *BRIP1* se středním rizikem. Nejčastěji jsme zárodečné mutace identifikovali v genech *BRCA1* (17,9% pacientek) a *BRCA2* (7,4% pacientek). Nosičky mutací v *BRCA1/2* představovaly 84% všech pozitivně testovaných pacientek. Z ostatních osmi genů asociovaných s karcinomem ovaria jsme nejvíce mutací našli v *RAD51C/RAD51D/BRIP1* (celkem 5% pacientek). Podobné frekvence popisují i zahraniční studie (Koczkowska et al. 2018, Krivokuca et al. 2019, Bonache et al. 2018).

Zárodečné mutace v MMR genech byly dohromady asociovány s vysokým rizikem vzniku karcinomu ovaria, přičemž nejvíce mutací jsme nalezli v genu *MLH1*, podobně jako je tomu u pacientů s Lynchovým syndromem s diagnózou kolorektálního karcinomu (Lynch and de la Chapelle 2003). Vysoká frekvence zárodečných mutací v predispozičních genech u pacientek s karcinomem ovaria analyzovaných v naší práci je v souladu řadou studií provedených v jiných populacích (Walsh et al. 2011, Krivokuca et al. 2019, Koczkowska et al. 2018, Harter et al. 2017), nicméně jiné práce uvádí výrazně nižší frekvenci mutací (Carter et al. 2018, Lilyquist et al. 2017). Naše studie ukazuje, na rozdíl od jiných prací (Lu et al. 2018, Ramus et al. 2015), asociaci mutací v *NBN* a *BARD1* se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria. Naopak pro nosičky mutací v genech *ATM* a *PALB2* jsme významně zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria nepozorovali, podobně jako v některé další práce (Lu et al. 2018, Ramus et al. 2015, Kurian et al. 2019). V genu *NF1* jsme nezachytili žádnou patogenní mutaci. Mutace v genech *CDH1* a *PTEN* byly extrémně vzácné. Podobně tomu bylo v případě mutací v genu *STK11*, ve kterém jsme v našem souboru pacientek nalezli 2 patogenní mutace.

Velké genomové přestavby v některém z 10 genů asociovaných s karcinomem ovaria byly nalezeny u 31/1333 pacientek (2,3%) a představovaly 7,6% patogenních mutací v těchto genech. Nejčastěji byly CNVs nalezeny v genu *BRCA1* (23x). Tyto výsledky korespondují se studií Lilyquist a kolektivu, kteří ve své práci publikovali frekvenci CNVs 7,5% (Lilyquist et al. 2017). Vyšetření panelu genů u pacientek s karcinomem ovaria odhalilo 13 nosiček mutací ve více než jenom genu (1,0% pacientek). Podobná frekvence vícenásobných nosiček mutací (multilocus inherited neoplasia alleles syndrome, MINAS (Whitworth et al. 2016)) byla ukázána v předchozích studiích (Stradella et al. 2018, Whitworth et al. 2018) a má význam zejména pro genetické poradenství v rodinách. Největší četnost mutací v *BRCA1/2* jsme zachytili ve skupině pacientek s duplicitním onemocněním karcinomu prsu a ovaria, zatímco mutace v genech *RAD51C/RAD51D//BRIP1* se dominantně vyskytovaly u pacientek pouze s diagnózou karcinomu ovaria. Distribuce mutací *RAD51C/RAD51D//BRIP1* v jednotlivých historických subtypech však byla podobná jako v případě *BRCA1/2*. Mutace *RAD51C/RAD51D//BRIP1* v naší práci převažovaly ve skupině pacientek bez pozitivní rodinné nádorové anamnézy (22/587; 3,7%), zatímco ve francouzské studii Castera a kolektivu byly popsány mutace v uvedených genech dominantně u žen s výskytem karcinomu ovaria v rodině (Castera et al. 2018). Dalším zajímavým zjištěním byla překvapivě vysoká frekvence mutací v genech predisponujících ke karcinomu ovaria u starších pacientek. Prevalence mutací u žen starších 60 let byla v naší práci 23,6%, zatímco Harter a kol. ve své práci uvádí mutace u 18,9% žen této věkové skupiny, přičemž četnost mutací u žen mladších 60 let byla podobná (32,6% vs. 33,2%). U pacientek mladších 60 let v době diagnózy dominovaly mutace v *BRCA1*, zatímco u pacientek starších 60 let byla frekvence mutací v *BRCA1* a *BRCA2* porovnatelná. Tomu odpovídá i vyšší medián věku v době diagnózy pro nosičky mutací v genu *BRCA2* (58,4 roku) oproti *BRCA1* (51 let). Zajímavým zjištěním byl rovněž nález 29 mutací v *BRCA1/2* ve skupině 208 pacientek (13,9%) starších 60 let s negativní rodinnou nádorovou anamnézou, na rozdíl od studie Morgan a kolektivu, kteří identifikovali u 46 žen se sporadickým karcinomem ovaria starších 60 let pouze 2 (4,3%) mutace v genech *BRCA1/2* (Morgan et al. 2019). Vysokou frekvenci mutací *BRCA1/2* (~18%) jsme nalezli i ve skupině nejstarších pacientek s diagnózou nad 70. rokem věku, zatímco v jiných studiích nepřesahovala frekvence mutací v *BRCA1/2* v této věkové kategorii pacientek 10% (Plaskocinska et al. 2016, Rust et al. 2018). Vysoká frekvence mutací *BRCA1/2* u nejstarší věkové kategorie kontrastuje s neočekávaně nízkou četností mutací u nejmladší analyzované skupiny pacientek,

kterým v době diagnózy bylo méně než 30 let a u kterých jsme nalezli mutace v *BRCA1/2* pouze v 3,6% případech (*p*=0,003). Rozdíl ve frekvenci mutací v *BRCA1/2* byl ještě významnější u pacientek se sporadickým karcinomem ovaria (bez pozitivní rodinné nádorové anamnézy), čímž jsme vyloučili vliv možného výraznějšího zastoupení pacientek s pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou ve skupině nejstarších pacientek. U 46 pacientek se sporadickým karcinomem vaječníků diagnostikovaným po 70. roce věku jsme zachytili 6 mutací *BRCA1/2* (13,3%), avšak žádnou mutaci ve skupině 52 pacientek se sporadickým karcinomem vaječníků diagnostikovaným do 30 let věku. Ačkoliv se u velmi mladých žen častěji vyskytují vzácné histologické tumory vaječníků, které nejsou na rozdíl od invazivních epiteliálních nádorů výrazně asociovány s mutacemi v *BRCA1/2*, v uvedené skupině 52 velmi mladých žen se sporadickým karcinomem ovaria přesto invazivní epiteliální ovariální karcinomy tvořily přibližně dvě třetin případů (65,3%; 32/49 informativních pacientek).

Na základě frekvence mutací v 10 genech predisponujících karcinomu ovaria lze histologické typy nádorů ovaria rozdělit do dvou skupin. Vysokou frekvenci mutací jsme pozorovali u HG-serózních, borderline a endometroidních nádorů, druhou skupinu s nízkou prevalencí mutací představovaly LG-serózní, mucinózní, světlobuněčné a další vzácné nádory ovaria. Poněkud překvapivě byla frekvence mutací u pacientek s BTO srovnatelná s frekvencí mutací s pacientkami s HG-serózním karcinomem ovaria (32,2% vs. 36,7%). Pro vyloučení vlivu rodinné nádorové anamnézy jsme analyzovali frekvenci mutací u sporadických HG-serózních karcinomů a BTO. U pacientek se sporadickým BTO byla frekvence mutací poloviční oproti sporadickým HG-serózním případům, nicméně i přesto frekvence mutací výrazně přesahovala 10%, což ukazuje na opodstatněnost genetického testování i u pacientek s BTO. v naší studii převažovaly pacientky s pokročilým stádiem onemocnění. Výjimku tvořily pouze pacientky, které byly nosičkami mutací v MMR reparačních genech, u kterých byl nádor, častěji endometroidní karcinom, diagnostikován spíše v časnějších stádiích. Podobný trend byl popsán v práci Watson a kolektivu (Watson et al. 2001). Přestože v našem souboru byl celkový počet mutací identifikovaných v genech MMR dráhy malý, nejvyšší frekvence mutací byla zachycena v genu *MLH1,* podobně jako u pacientů s Lynchovým syndromem s diagnózou karcinomu kolorekta (Lynch and de la Chapelle 2003). V naší studii jsme v rámci dalších 201 testovaných nalezli řadu trunkačních mutací postihujících různé geny. Nicméně zvýšený výskyt mutací ve skupině pacientek s karcinomem ovaria jsme pozorovali pouze v případě genů *PPM1D*, *NAT1* a *SHPRH*. Po Bonferroniho korekci zohledňující multigenové testování byl jediným kandidátem gen *PPM1D* kódující fosfatázu WIP1. Ve všech případech se jednalo o „gain-of-function“ mutace vedoucí ke zvýšené fosfatázové aktivitě WIP1 a mutace byly, podobně jako v jiných studiích, přítomny ve formě mozaiky (Ruark et al. 2013, Akbari et al. 2014, Kleiblova et al. 2013). Zárodečné mutace genu *NAT1,* který kóduje arylamin N-acetyltransferázu 1 zapojenou v metabolizmu karcinogenů, nebyly doposud v souvislosti s rizikem vzniku karcinomu ovaria analyzovány. Existují však studie poukazující na modifikaci rizika vzniku různých nádorových onemocnění v případě některých polymorfizmů v tomto genu (Butcher and Minchin 2012, Hein, Fakis, and Boukouvala 2018).

Vztah mutací v genu *SHPRH* k riziku vzniku karcinomu ovaria není znám. Mimo výše uvedené možné kandidátní geny jsme také nalezli vzácné mutace v genech rodiny Fanconiho anemie. V FA genech (*FANCG*, *FANCD2* a *FANCA*) jsme mutace identifikovali u 11/1333 (0,83%) pacientek a 5/2278 (0,2%) populačně specifických kontrol s kumulativním OR=3,78 (95% CI 1,21-13,91; *p*=0,02). Zajímavé je, že tyto vzácné mutace byly nalezeny téměř výhradně u pacientek bez mutace v některém z 10 genů asociovaných s karcinomem ovaria.

ZÁVĚR

V naší studii jsme ukázali, že téměř třetina pacientek s karcinomem ovaria v naší populaci nese zárodečnou mutaci v některém z genů signifikantně asociovaných s rizikem vzniku karcinomu ovaria. Frekvence patogenních mutací v těchto genech převyšovala hranici 10% ve všech klinicko-patologických podskupinách pacientek, tedy bez ohledu na věk v době diagnózy, či klinické nebo histopatologické charakteristiky, s výjimkou velmi mladých žen s diagnózou karcinomu ovaria do 30 let a žen se vzácným histologickým typem nádoru. V ČR je v současné době indikována ke genetickému testování každá žena s invazivním karcinomem ovaria. Naše studie potvrdila opodstatněnost rozšíření indikačních kritérií. V naší práci jsme zachytili vysokou frekvenci mutací také u pacientek s BTO, naopak mutace *BRCA1/2* nebyly asociovány se vznikem sporadického karcinomu ovaria u velmi mladých žen. Mimo zavedené geny jsme prokázali statisticky významnou asociaci mutací v genech *NBN* a *BARD1* se středním rizikem vzniku karcinomu ovaria, nicméně pro přesné určení výše rizika či význam mutací v těchto genech ve smyslu prognostickém a prediktivním bude vyžadovat další analýzy. Identifikace dalších genů s prediktivním a/nebo prognostickým potenciálem bude, vzhledem k jejich nízké frekvenci mutací, vyžadovat analýzy rozsáhlých skupin pacientek a mezinárodní spolupráci.

CITACE

Akbari, M. R., P. Lepage, B. Rosen, J. McLaughlin, H. Risch, M. Minden, and S. A. Narod. 2014. "PPM1D mutations in circulating white blood cells and the risk for ovarian cancer." *J Natl Cancer Inst* 106 (1):djt323. doi: 10.1093/jnci/djt323.

Bonache, S., I. Esteban, A. Moles-Fernandez, A. Tenes, L. Duran-Lozano, G. Montalban, V. Bach, E. Carrasco, N. Gadea, A. Lopez-Fernandez, S. Torres-Esquius, F. Mancuso, G. Caratu, A. Vivancos, N. Tuset, J. Balmana, S. Gutierrez-Enriquez, and O. Diez. 2018. "Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings." *J Cancer Res Clin Oncol* 144 (12):2495-2513. doi: 10.1007/s00432-018-2763-9.

Bouda J, Presl J, Vlasák P, Kosťun J, Sluněčko R. 2018. "Nový pohled na etiopatogenezi ovariálního karcinomu." *Actual Gyn.* 10:19-22.

Butcher, N. J., and R. F. Minchin. 2012. "Arylamine N-acetyltransferase 1: a novel drug target in cancer development." *Pharmacol Rev* 64 (1):147-65. doi: 10.1124/pr.110.004275.

Carter, N. J., M. L. Marshall, L. R. Susswein, K. K. Zorn, S. Hiraki, K. J. Arvai, R. I. Torene, A. K. McGill, L. Yackowski, P. D. Murphy, Z. Xu, B. D. Solomon, R. T. Klein, and K. S. Hruska. 2018. "Germline pathogenic variants identified in women with ovarian tumors." *Gynecol Oncol* 151 (3):481-488. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.09.030.

Castera, L., V. Harter, E. Muller, S. Krieger, N. Goardon, A. Ricou, A. Rousselin, G. Paimparay, A. Legros, O. Bruet, C. Quesnelle, F. Domin, C. San, B. Brault, R. Fouillet, C. Abadie, O. Bera, P. Berthet, Consortium French Exome Project, T. Frebourg, and D. Vaur. 2018. "Landscape of pathogenic variations in a panel of 34 genes and cancer risk estimation from 5131 HBOC families." *Genet Med* 20 (12):1677-1686. doi: 10.1038/s41436-018-0005-9.

Ferlay, J., D. M. Parkin, and E. Steliarova-Foucher. 2010. "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." *European Journal of Cancer* 46 (4):765-781. doi: 10.1016/j.ejca.2009.12.014.

Goodman, Marc T., Holly L. Howe, Ko Hui Tung, Joellyn Hotes, Barry A. Miller, Steven S. Coughlin, and Vivien W. Chen. 2003. "Incidence of ovarian cancer by race and ethnicity in the United States, 1992–1997." *Cancer* 97 (120):2676-2685. doi: doi:10.1002/cncr.11349.

Gronwald, J., J. Lubinski, T. Huzarski, C. Cybulski, J. Menkiszak, M. Siołek, M. Stawicka, P. Sun, S. J. Kim, J. Kotsopoulos, and S. A. Narod. 2019. "A comparison of ovarian cancer mortality in women with BRCA1 mutations undergoing annual ultrasound screening or preventive oophorectomy." *Gynecol Oncol* 155 (2):270-274. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.08.034.

Harter, P., J. Hauke, F. Heitz, A. Reuss, S. Kommoss, F. Marme, A. Heimbach, K. Prieske, L. Richters, A. Burges, G. Neidhardt, N. de Gregorio, A. El-Balat, F. Hilpert, W. Meier, R. Kimmig, K. Kast, J. Sehouli, K. Baumann, C. Jackisch, T. W. Park-Simon, L. Hanker, S. Krober, J. Pfisterer, H. Gevensleben, A. Schnelzer, D. Dietrich, T. Neunhoffer, M. Krockenberger, S. Y. Brucker, P. Nurnberg, H. Thiele, J. Altmuller, J. Lamla, G. Elser, A. du Bois, E. Hahnen, and R. Schmutzler. 2017. "Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1)." *PLoS One* 12 (10):e0186043. doi: 10.1371/journal.pone.0186043.

Hein, D. W., G. Fakis, and S. Boukouvala. 2018. "Functional expression of human arylamine N-acetyltransferase NAT1*10 and NAT1*11 alleles: a mini review." *Pharmacogenet Genomics* 28 (10):238-244. doi: 10.1097/fpc.0000000000000350.

Kleiblova, P., I. A. Shaltiel, J. Benada, J. Sevcik, S. Pechackova, P. Pohlreich, E. E. Voest, P. Dundr, J. Bartek, Z. Kleibl, R. H. Medema, and L. Macurek. 2013. "Gain-of-function mutations of

PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint." *J Cell Biol* 201 (4):511-21. doi: 10.1083/jcb.201210031.

Kleiblova, P., L. Stolarova, K. Krizova, F. Lhota, J. Hojny, P. Zemankova, O. Havranek, M. Vocka, M. Cerna, K. Lhotova, M. Borecka, M. Janatova, J. Soukupova, J. Sevcik, M. Zimovjanova, J. Kotlas, A. Panczak, K. Vesela, J. Cervenkova, M. Schneiderova, M. Burocziova, K. Burdova, V. Stranecky, L. Foretova, E. Machackova, S. Tavandzis, S. Kmoch, L. Macurek, and Z. Kleibl. 2019. "Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer." *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.32385.

Koczkowska, M., N. Krawczynska, M. Stukan, A. Kuzniacka, I. Brozek, M. Sniadecki, J. Debniak, D. Wydra, W. Biernat, P. Kozlowski, J. Limon, B. Wasag, and M. Ratajska. 2018. "Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients." *Cancers (Basel)* 10 (11). doi: 10.3390/cancers10110442.

Krivokuca, A., I. Boljevic, S. Jovandic, Z. Magic, A. Mandic, Z. Tomasevic, and M. Brankovic-Magic. 2019. "Germline mutations in cancer susceptibility genes in high grade serous ovarian cancer in Serbia." *J Hum Genet*. doi: 10.1038/s10038-019-0562-z.

Kurian, A. W., K. C. Ward, N. Howlader, D. Deapen, A. S. Hamilton, A. Mariotto, D. Miller, L. S. Penberthy, and S. J. Katz. 2019. "Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients." *J Clin Oncol*:JCO1801854. doi: 10.1200/JCO.18.01854.

Lhota, F., P. Zemankova, P. Kleiblova, J. Soukupova, M. Vocka, V. Stranecky, M. Janatova, H. Hartmannova, K. Hodanova, S. Kmoch, and Z. Kleibl. 2016. "Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1/BRCA2/PALB2-negatively tested breast cancer patients." *Clin Genet*. doi: 10.1111/cge.12748.

Lhotova, K., L. Stolarova, P. Zemankova, M. Vocka, M. Janatova, M. Borecka, M. Cerna, S. Jelinkova, J. Kral, Z. Volkova, M. Urbanova, P. Kleiblova, E. Machackova, L. Foretova, J. Hazova, P. Vasickova, F. Lhota, M. Koudova, L. Cerna, S. Tavandzis, J. Indrakova, L. Hruskova, M. Kosarova, R. Vrtel, V. Stranecky, S. Kmoch, M. Zikan, L. Macurek, Z. Kleibl, and J. Soukupova. 2020. "Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer." *Cancers (Basel)* 12 (4). doi: 10.3390/cancers12040956.

Lilyquist, J., H. LaDuca, E. Polley, B. T. Davis, H. Shimelis, C. Hu, S. N. Hart, J. S. Dolinsky, F. J. Couch, and D. E. Goldgar. 2017. "Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls." *Gynecol Oncol* 147 (2):375-380. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.08.030.

Lu, H. M., S. Li, M. H. Black, S. Lee, R. Hoiness, S. Wu, W. Mu, R. Huether, J. Chen, S. Sridhar, Y. Tian, R. McFarland, J. Dolinsky, B. Tippin Davis, S. Mexal, C. Dunlop, and A. Elliott. 2018. "Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing." *JAMA Oncol*. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2956.

Lynch, H. T., and A. de la Chapelle. 2003. "Hereditary colorectal cancer." *N Engl J Med* 348 (10):919-32. doi: 10.1056/NEJMra012242.

Morgan, R. D., G. J. Burghel, N. Flaum, M. Bulman, A. R. Clamp, J. Hasan, C. L. Mitchell, H. Schlecht, E. R. Woodward, F. I. Lallo, E. J. Crosbie, R. J. Edmondson, A. J. Wallace, G. C. Jayson, and D. G. R. Evans. 2019. "Prevalence of germline pathogenic BRCA1/2 variants in sequential epithelial ovarian cancer cases." *J Med Genet* 56 (5):301-307. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105792.

Nagy, R., K. Sweet, and C. Eng. 2004. "Highly penetrant hereditary cancer syndromes." *Oncogene* 23 (38):6445-70. doi: 10.1038/sj.onc.1207714.

Plaskocinska, I., H. Shipman, J. Drummond, E. Thompson, V. Buchanan, B. Newcombe, C. Hodgkin, E. Barter, P. Ridley, R. Ng, S. Miller, A. Dann, V. Licence, H. Webb, L. T. Tan, M. Daly, S.

Ayers, B. Rufford, H. Earl, C. Parkinson, T. Duncan, M. Jimenez-Linan, G. S. Sagoo, S. Abbs, N. Hulbert-Williams, P. Pharoah, R. Crawford, J. D. Brenton, and M. Tischkowitz. 2016. "New paradigms for BRCA1/BRCA2 testing in women with ovarian cancer: results of the Genetic Testing in Epithelial Ovarian Cancer (GTEOC) study." *J Med Genet* 53 (10):655-61. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103902.

Prat, J. 2014. "Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum." *Int J Gynaecol Obstet* 124 (1):1-5. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.10.001.

Ramus, S. J., H. Song, E. Dicks, J. P. Tyrer, A. N. Rosenthal, M. P. Intermaggio, L. Fraser, A. Gentry-Maharaj, J. Hayward, S. Philpott, C. Anderson, C. K. Edlund, D. Conti, P. Harrington, D. Barrowdale, D. D. Bowtell, K. Alsop, G. Mitchell, Aocs Study Group, M. S. Cicek, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, J. Alsop, M. Jimenez-Linan, S. Poblete, S. Lele, L. Sucheston-Campbell, K. B. Moysich, W. Sieh, V. McGuire, J. Lester, N. Bogdanova, M. Durst, P. Hillemanns, Consortium Ovarian Cancer Association, K. Odunsi, A. S. Whittemore, B. Y. Karlan, T. Dork, E. L. Goode, U. Menon, I. J. Jacobs, A. C. Antoniou, P. D. Pharoah, and S. A. Gayther. 2015. "Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer." *J Natl Cancer Inst* 107 (11). doi: 10.1093/jnci/djv214.

Ruark, E., K. Snape, P. Humburg, C. Loveday, I. Bajrami, R. Brough, D. N. Rodrigues, A. Renwick, S. Seal, E. Ramsay, V. Duarte Sdel, M. A. Rivas, M. Warren-Perry, A. Zachariou, A. Campion-Flora, S. Hanks, A. Murray, N. Ansari Pour, J. Douglas, L. Gregory, A. Rimmer, N. M. Walker, T. P. Yang, J. W. Adlard, J. Barwell, J. Berg, A. F. Brady, C. Brewer, G. Brice, C. Chapman, J. Cook, R. Davidson, A. Donaldson, F. Douglas, D. Eccles, D. G. Evans, L. Greenhalgh, A. Henderson, L. Izatt, A. Kumar, F. Lalloo, Z. Miedzybrodzka, P. J. Morrison, J. Paterson, M. Porteous, M. T. Rogers, S. Shanley, L. Walker, M. Gore, R. Houlston, M. A. Brown, M. J. Caufield, P. Deloukas, M. I. McCarthy, J. A. Todd, C. Turnbull, J. S. Reis-Filho, A. Ashworth, A. C. Antoniou, C. J. Lord, P. Donnelly, and N. Rahman. 2013. "Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer." *Nature* 493 (7432):406-10. doi: 10.1038/nature11725.

Rust, K., P. Spiliopoulou, C. Y. Tang, C. Bell, D. Stirling, T. Phang, R. Davidson, M. Mackean, F. Nussey, R. M. Glasspool, N. S. Reed, A. Sadozye, M. Porteous, T. McGoldrick, M. Ferguson, Z. Miedzybrodzka, I. A. McNeish, and C. Gourley. 2018. "Routine germline BRCA1 and BRCA2 testing in patients with ovarian carcinoma: analysis of the Scottish real-life experience." *BJOG* 125 (11):1451-1458. doi: 10.1111/1471-0528.15171.

Soukupova, J., P. Zemankova, K. Lhotova, M. Janatova, M. Borecka, L. Stolarova, F. Lhota, L. Foretova, E. Machackova, V. Stranecky, S. Tavandzis, P. Kleiblova, M. Vocka, H. Hartmannova, K. Hodanova, S. Kmoch, and Z. Kleibl. 2018. "Validation of CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes." *PLoS One* 13 (4):e0195761. doi: 10.1371/journal.pone.0195761.

Stradella, A., J. Del Valle, P. Rofes, L. Feliubadalo, E. Grau Garces, A. Velasco, S. Gonzalez, G. Vargas, A. Izquierdo, O. Campos, E. Tornero, M. Navarro, J. Balmana-Gelpi, G. Capella, M. Pineda, J. Brunet, and C. Lazaro. 2018. "Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression?" *J Med Genet*. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105700.

Walsh, T., S. Casadei, M. K. Lee, C. C. Pennil, A. S. Nord, A. M. Thornton, W. Roeb, K. J. Agnew, S. M. Stray, A. Wickramanayake, B. Norquist, K. P. Pennington, R. L. Garcia, M. C. King, and E. M. Swisher. 2011. "Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (44):18032-7. doi: 10.1073/pnas.1115052108.

Watson, P., R. Butzow, H. T. Lynch, J. P. Mecklin, H. J. Jarvinen, H. F. Vasen, L. Madlensky, P. Fidalgo, I. Bernstein, and Hnpcc International Collaborative Group on. 2001. "The clinical

features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Gynecol Oncol* 82 (2):223-8. doi: 10.1006/gyno.2001.6279.

Whitworth, J., A. B. Skytte, L. Sunde, D. H. Lim, M. J. Arends, L. Happerfield, I. M. Frayling, R. van Minkelen, E. R. Woodward, M. D. Tischkowitz, and E. R. Maher. 2016. "Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome: A Case Series and Review." *JAMA Oncol* 2 (3):373-9. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.4771.

Whitworth, J., P. S. Smith, J. E. Martin, H. West, A. Luchetti, F. Rodger, G. Clark, K. Carss, J. Stephens, K. Stirrups, C. Penkett, R. Mapeta, S. Ashford, K. Megy, H. Shakeel, M. Ahmed, J. Adlard, J. Barwell, C. Brewer, R. T. Casey, R. Armstrong, T. Cole, D. G. Evans, F. Fostira, L. Greenhalgh, H. Hanson, A. Henderson, J. Hoffman, L. Izatt, A. Kumar, A. Kwong, F. Lalloo, K. R. Ong, J. Paterson, S. M. Park, R. Chen-Shtoyerman, C. Searle, L. Side, A. B. Skytte, K. Snape, E. R. Woodward, Nihr BioResource Rare Diseases Consortium, M. D. Tischkowitz, and E. R. Maher. 2018. "Comprehensive Cancer-Predisposition Gene Testing in an Adult Multiple Primary Tumor Series Shows a Broad Range of Deleterious Variants and Atypical Tumor Phenotypes." *Am J Hum Genet* 103 (1):3-18. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.04.013.

Masarykův onkologický ústav, 2019. Karcinom vaječníků a vejcovodu.

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce:

Lhotova, K., L. Stolarova, P. Zemankova, M. Vocka, M. Janatova, M. Borecka, M. Cerna, S. Jelinkova, J. Kral, Z. Volkova, M. Urbanova, P. Kleiblova, E. Machackova, L. Foretova, J. Hazova, P. Vasickova, F. Lhota, M. Koudova, L. Cerna, S. Tavandzis, J. Indrakova, L. Hruskova, M. Kosarova, R. Vrtel, V. Stranecky, S. Kmoch, M. Zikan, L. Macurek, Z. Kleibl, and J. Soukupova. 2020. "*Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer.*" *Cancers (Basel)* 12 (4). doi: 10.3390/cancers12040956. **IF= 6,126**

Kleiblova, P., L. Stolarova, K. Krizova, F. Lhota, J. Hojny, P. Zemankova, O. Havranek, M. Vocka, M. Cerna, K. **Lhotova**, M. Borecka, M. Janatova, J. Soukupova, J. Sevcik, M. Zimovjanova, J. Kotlas, A. Panczak, K. Vesela, J. Cervenkova, M. Schneiderova, M. Burocziova, K. Burdova, V. Stranecky, L. Foretova, E. Machackova, S. Tavandzis, S. Kmoch, L. Macurek, and Z. Kleibl. 2019. "*Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer*." *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.32385. **IF= 5,145**

Soukupova, J., P. Zemankova, K. **Lhotova**, M. Janatova, M. Borecka, L. Stolarova, F. Lhota, L. Foretova, E. Machackova, V. Stranecky, S. Tavandzis, P. Kleiblova, M. Vocka, H. Hartmannova, K. Hodanova, S. Kmoch, and Z. Kleibl. 2018. "*Validation of CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes.*" *PLoS One* 13 (4):e0195761. doi: 10.1371/journal.pone.0195761. **IF= 2,740**

Publikace bez IF, které jsou podkladem dizertační práce:

Soukupova, J., K. **Lhotova**, P. Zemankova, M. Vocka, M. Janatova, L. Stolarova, M. Borecka, P. Kleiblova, E. Machackova, L. Foretova, M. Koudova, F. Lhota, S. Tavandzis, M. Zikan, V. Stranecky, K. Vesela, A. Panczak, J. Kotlas, and Z. Kleibl. 2019. "Contribution of Massive Parallel Sequencing to Diagnosis of Hereditary Ovarian Cancer in the Czech Republic." *Klin Onkol* 32 (Supplementum2):72-78. doi: 10.14735/amko2019S72.

Publikace s IF a bez vztahu k tématu disertace:

Lovecek, M., M. Janatova, P. Skalicky, T. Zemanek, R. Havlik, J. Ehrmann, O. Strouhal, P. Zemankova, K. **Lhotova**, M. Borecka, J. Soukupova, H. Svebisova, P. Soucek, V. Hlavac, Z. Kleibl, C. Neoral, B. Melichar, and B. Mohelnikova-Duchonova. 2019. "Genetic analysis of subsequent second primary malignant neoplasms in long-term pancreatic cancer survivors suggests new potential hereditary genetic alterations." *Cancer Manag Res* 11:599-609. doi: 10.2147/cmar.s185352. **IF= 2,886**

Burke, L. J., J. Sevcik, G. Gambino, E. Tudini, E. J. Mucaki, B. C. Shirley, P. Whiley, M. T. Parsons, K. De Leeneer, S. Gutierrez-Enriquez, M. Santamarina, S. M. Caputo, E. Santana Dos Santos, J. Soukupova, M. Janatova, P. Zemankova, K. **Lhotova**, L. Stolarova, M. Borecka, A. Moles-Fernandez, S. Manoukian, B. Bonanni, S. L. Edwards, M. J. Blok, T. van Overeem Hansen, M. Rossing, O. Diez, A. Vega, K. B. M. Claes, D. E. Goldgar, E. Rouleau, P. Radice, P. Peterlongo, P. K. Rogan, M. Caligo, A. B. Spurdle, and M. A. Brown. 2018. "BRCA1 and BRCA2 5' noncoding region variants identified in breast cancer patients alter promoter activity and protein binding." *Hum Mutat* 39 (12):2025-2039. doi: 10.1002/humu.23652. **IF=5,359**

Publikace bez IF a bez vztahu k tématu disertace:

Kleiblova, P., L. Stolarova, K. Krizova, F. Lhota, J. Hojny, P. Zemankova, O. Havranek, M. Vocka, M. Cerna, K. **Lhotova**, M. Borecka, M. Janatova, J. Soukupova, J. Sevcik, M. Zimovjanova, J. Kotlas, A. Panczak, K. Vesela, J. Cervenkova, M. Schneiderova, M. Burocziova, K. Burdova, V. Stranecky, L. Foretova, E. Machackova, S. Tavandzis, S. Kmoch, L. Macurek, and Z. Kleibl. 2019. "Germline CHEK2 Gene Mutations in Hereditary Breast Cancer Predisposition - Mutation Types and their Biological and Clinical Relevance." *Klin Onkol* 32 (Supplementum2):36-50. doi: 10.14735/amko2019S36.