Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Habilitační práce

Komplexní charakteristika světlobuněčného karcinomu ovaria s využitím imunohistochemických a molekulárně genetických metod

MUDr. Michaela Kendall Bártů, Ph.D.

Praha, 2025

Název habilitační práce: Komplexní charakteristika světlobuněčného karcinomu ovaria s využitím imunohistochemických a molekulárně genetických metod

Autor: MUDr. Michaela Kendall Bártů, Ph.D.

Forma habilitační práce: Soubor vědeckých prací doplněný komentářem

Podpora habilitační práce: Habilitační práce byla vypracována s podporou grantového projektu AZV NV19-03-00007 a dále projektů RVO VFN 64165, UNCE204065 a BBMRI_CZ LM2023033.

Pracoviště: Ústav patologie
1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
Studničkova 2
Praha 2
128 00

Seznam použitých zkratek

ADC	konjugát protilátky a chemoterapeutického léčiva
CAP	College of American Pathologists
CBDCA	karboplatina
CCC	světlobuněčný karcinom
EOC	endometroidní karcinom ovaria
ER	estrogenový receptor
ESMO	European Society for Medical Oncology
FA	fragmentační analýza
FDA	Food and Drug Administration
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GEJ	gastroesofageální junkce
HDAC	histondeacetyláza
HER2	humánní epidermální receptor 2
HGSC	high grade serózní karcinom
IHC	imunohistochemie / imunohistochemický
LCNEC	velkobuněčný neuroendokrinní karcinom
LGSC	low grade serózní karcinom
MBT	mucinózní borderline tumor
MC	mucinózní karcinom
MMR	mismatch repair
mSBT	mikropapilární varianta serózního borderline tumoru
MSI	mikrosatelitová instabilita
MSS	mikrosatelitně stabilní
NE	neuroendokrinní

NEC	neuroendokrinní karcinom
NGS	sekvenování nové generace
NSMP	nespecifický molekulární profil
OCCC	světlobuněčný karcinom ovaria
OS	celkové přežití
PARP	polymeráza polyADP-ribóza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD-1	receptor programované buněčné smrti 1
PD-L1	ligand programované buněčné smrti 1
PD-L2	ligand programované buněčné smrti 2
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza
PR	progesteronový receptor
RFS	přežití bez rekurence
SAHA	suberoylanilid hydroxamin
SCNEC	malobuněčný neuroendokrinní karcinom
TAA	tumor asociovaný antigen
TCR	T-buněčný receptor
TCGA	The Cancer Genome Atlas
T-DM1	Trastuzumab Emtansine
T-Dxd	Trastuzumab Deruxtecan
TMA	tkáňový mikročip
TMB	nádorová mutační nálož

Seznam publikací, které jsou podkladem habilitační práce

1. **Kendall Bártů M**, Němejcová K, Michálková R, Bui QH, Drozenová J, Fabian P, Fadare O, Hausnerová J, Laco J, Matěj R, Méhes G, Šafanda A, Singh N, Škapa P, Špůrková Z, Stolnicu S, Švajdler M, Lax SF, McCluggage WG, Dundr P. Neuroendocrine Marker Expression in Primary Non-neuroendocrine Epithelial Tumors of the Ovary: A Study of 551 Cases. Int J Gynecol Pathol. 2024 Mar 1;43(2):123-133. doi: 10.1097/PGP.0000000000000962. Epub 2023 Jun 14. PMID: 37406366. (IF 2023 = 1,6, Q3)
2. Šafanda A, **Kendall Bártů M**, Michálková R, Stružinská I, Drozenová J, Fabián P, Hausnerová J, Laco J, Matěj R, Škapa P, Švajdler M, Špůrková Z, Méhes G, Dundr P, Němejcová K. Immunohistochemical expression of PRAME in 485 cases of epithelial tubo-ovarian tumors. Virchows Arch. 2023 Oct;483(4):509-516. doi: 10.1007/s00428-023-03629-z. Epub 2023 Aug 23. PMID: 37610627. (IF 2023 = 3,4; Q1)
3. **Kendall Bártů M**, Němejcová K, Michálková R, Stružinská I, Hájková N, Hojný J, Krkavcová E, Laco J, Matěj R, Drozenová J, Méhes G, Fabian P, Hausnerová J, Švajdler M, Škapa P, Cibula D, Zima T, Dundr P. HER2 status as a potential predictive biomarker for ovarian clear cell carcinoma. Virchows Arch. 2023 Oct;483(4):497-507. doi: 10.1007/s00428-023-03640-4. Epub 2023 Sep 7. PMID: 37676270. (IF 2023 = 3,4; Q1)
4. Stružinská I, Hájková N, Hojný J, Krkavcová E, Michálková R, Dvořák J, Němejcová K, Matěj R, Laco J, Drozenová J, Fabian P, Hausnerová J, Méhes G, Škapa P, Švajdler M, Cibula D, Frühauf F, **Bártů MK**, Dundr P. A comprehensive molecular analysis of 113 primary ovarian clear cell carcinomas reveals common therapeutically significant aberrations. Diagn Pathol. 2023 Jun 12;18(1):72. doi: 10.1186/s13000-023-01358-0. PMID: 37303048; PMCID: PMC10259037. (IF 2023 = 2,4; Q2)
5. Hájková N, **Bártů MK**, Cibula D, Drozenová J, Fabian P, Fadare O, Frühauf F, Hausnerová J, Hojný J, Krkavcová E, Laco J, Lax SF, Matěj R, Méhes G, Michálková R, Němejcová K, Singh N, Stolnicu S, Švajdler M, Zima T, McCluggage WG, Stružinská I, Dundr P. Microsatellite instability in non-endometrioid ovarian epithelial tumors: a study of 400 cases comparing immunohistochemistry, PCR, and NGS based testing with mutation status of MMR genes. Transl Res. 2023 Oct;260:61-68. doi: 10.1016/j.trsl.2023.05.004. Epub 2023 May 25. PMID: 37244485. (IF 2023 = 6,4; Q1)

Poděkování

Největší poděkování patří prof. MUDr. Pavlu Dundrovi, Ph.D., přednostovi Ústavu patologie 1. LF UK a VFN, za neutuchající pomoc, podporu a důvěru ve všech aspektech vědecké práce. Dále bych ráda poděkovala doc. MUDr. Kristýně Němejcové, Ph.D. za cenné rady a všestrannou podporu. V neposlední řadě patří poděkování také mým kolegům RNDr. Janu Hojnému, Ph.D., Mgr. Nikole Hájkové, Ph.D., a RNDr. Ivaně Stružinské, Ph.D. z laboratoře molekulární patologie za jejich odbornou pomoc a spolupráci při řešení molekulární části projektu.

Obsah

1. Úvod 8

2. Imunohistochemická analýza OCCC za účelem diferenciálně diagnostickým a prognostickým 11

2.1 Hodnocení exprese neuroendokrinních markerů u primárních světlobuněčných karcinomů ovaria 12

2.2 Hodnocení exprese PRAME u primárních světlobuněčných karcinomů ovaria 15

3. Kombinované imunohistochemické a molekulárně-genetické analýzy OCCC s primárně prediktivním významem 17

3.1 Analýza stavu HER2 jako potenciální prediktivní biomarker pro OCCC 17

3.2 Analýza mikrosatelitového stavu CCC ovaria a její význam 20

4. Molekulárně-genetická analýza CCC ovaria s ohledem na charakteristiku spektra aberací a jejich diagnostický, prognostický a prediktivní význam 23

5. Závěr 27

6. Publikace in extenso 29

6.1 Neuroendocrine Marker Expression in Primary Non-neuroendocrine Epithelial Tumors of the Ovary: A Study of 551 Cases 29

6.2 Immunohistochemical expression of PRAME in 485 cases of epithelial 29

tubo-ovarian tumors 29

6.3 HER2 status as a potential predictive biomarker for ovarian clear cell 29

carcinoma 29

6.4 A comprehensive molecular analysis of 113 primary ovarian clear cell carcinomas 29

reveals common therapeutically significant aberrations 29

6.5 Microsatellite instability in non-endometrioid ovarian epithelial tumors: a study of 400 cases comparing immunohistochemistry, PCR, and NGS based testing with mutation status of MMR genes 29

7. Seznam použité literatury 30

1. Úvod

Epitelové nádory ovaria představují nejčastější skupinu ovariálních nádorů a zároveň gynekologickou malignitu s nejvyšší mortalitou; v roce 2020 dosáhl celosvětový počet úmrtí na karcinom ovaria více než 200 000 případů [1]. Jedná se o heterogenní skupinu nádorů, které se vyznačují odlišnou morfologií, patogenezí, rizikovými faktory, prekurzory, a v neposlední řadě také odpovědí na terapii a prognózou. Skupina karcinomů ovaria zahrnuje zejména high grade serózní karcinom, který jako nejčastější tvoří přibližně 70 % všech ovariálních karcinomů, a dále vzácnější jednotky v podobě světlobuněčného karcinomu (10 – 12 %), endometroidního karcinomu (10 %), low grade serózního karcinomu (5 %) a mucinózního karcinomu (3 – 4 %) [2, 3]**.** Velmi vzácně se vyskytující karcinomy ovaria zahrnují maligní Brennerův tumor, „mesonephric-like“ adenokarcinom, nediferencovaný/dediferencovaný karcinom, smíšený karcinom a karcinosarkom.

Světlobuněčný karcinom (clear cell carcinoma, CCC) tedy patří mezi méně časté ovariální karcinomy, přičemž dle nejnovějších údajů z roku 2021 se jeho zastoupení udává jako 5,75 % ze všech ovariálních karcinomů [4]. Jedním z důvodů pro tento pokles ve výskytu by mohla být zejména zpřesněná diagnostika, kdy se s rozvojem imunohistochemických metod ukazuje, že řada dříve diagnostikovaných CCC ve skutečnosti představuje jiné ovariální karcinomy. CCC ovaria je malignita s geograficky nerovnoměrnou distribucí, s nejvyšší prevalencí v zemích východní Asie (zejména v Japonsku), nižším výskytem v severní Americe a Evropě, a nejnižším výskytem v Severní Africe [1].

Histopatologicky je světlobuněčný karcinom ovaria (OCCC) charakterizovaný okrouhlými buňkami se světlou až vodojasnou cytoplazmou, které někdy nabývají „cvočkovitého“ (hobnail) vzhledu s kulatými jádry, jež protrudují směrem k apikálnímu povrchu buněk. Buňky se světlou cytoplazmou ovšem nejsou samy o sobě nálezem, který by byl specifický pouze pro jeden histotyp nádorů – světlá cytoplazma je pouze výsledkem hromadění určitých látek (zejména glykogenu), což je fenomén, který se vyskytuje u celé řady dalších nádorů. V rámci lézí ženského genitálu je primárně světlá cytoplazma charakteristická také pro dysgerminom, nádor ze žloutkového váčku (yolk sac tumor), nádor ze Sertoliho-Leydigových buněk, nádory ze steroidních buněk, a juvenilní nádor z buněk granulózy. Epiteloidní hladkosvalové nádory (které se ovšem vyskytují zejména v těle děložním) mohou také často vykazovat nápadně světlou cytoplazmu. Světlobuněčnou přeměnu ale typicky vykazuje také high grade serózní karcinom (HGSC) a endometroidní karcinom (EOC), kdy se může jednat i o změnu po chemoterapii. Významnou skupinu lézí představují také metastázy

v ovariu, kdy světlobuněčnou morfologii může vykazovat zejména světlobuněčný karcinom ledviny, v některých případech melanom, a také metastázy z gastrointestinálního traktu (především z pankreatobiliární oblasti či z tlustého střeva). Světlé buňky se vyskytují také u některých nenádorových lézí ženského genitálu, například u Arias-Stella reakce v endometrióze, nebo u inkluzních cyst s hydropickou přeměnou [5].

Ačkoliv jsou buňky se světlou cytoplazmou pro OCCC charakteristické, vyskytovat se také mohou případy, kdy je cytoplazma nádorových buněk fokálně či difúzně eosinofilní, případně může obsahovat hyalinní globule. V některých případech obsahují nádorové buňky psammomatoidní nebo targetoidní tělíska. Pro diagnózu OCCC tak je tak z hlediska morfologie vždy nejdůležitější architektonické uspořádání nádoru, cytologické charakteristiky nádorových buněk, a také spíše nízká proliferační aktivita. Z hlediska architektoniky se popisují 3 základní morfologické typy OCCC – papilární, tubulocystický, a solidní. Prototypickým uspořádáním OCCC je papilární architektonika, kdy nádor tvoří malé papily, lemované jednou vrstvou nádorových buněk. Stroma papil je typicky hyalinizované, může být ale i zánětlivě celulizované anebo nespecificky prosáklé (což se považuje za stádium předcházející vývoji hyalinizace). Ačkoliv je papilární uspořádání pro OCCC nejvíce typické, nádory často vykazují architektonickou heterogenitu s kombinací všech tří popsaných typů uspořádání, kdy zejména nádory s převažující tubulocystickou či solidní úpravou můžou výrazně napodobovat jiné karcinomy ovaria, a diagnóza by tak vždy měla být doplněná alespoň základním panelem imunohistochemického vyšetření.

Na imunohistochemické (IHC) úrovni je OCCC charakterizován expresí markerů světlobuněčné diferenciace jako je napsin A (pozitivní ve více než 90 % případů), HNF1B (pozitivní v 85 – 93 %), a AMACR (pozitivní u 75 – 80 % případů) [6-17]. OCCC typicky nevykazuje expresi WT1, což má význam zejména z hlediska diferenciálně diagnostického odlišení od HGSC, který je naopak zpravidla difúzně WT1 pozitivní. Hormonální markery ER a PR jsou u OCCC zpravidla negativní, čímž se OCCC odlišuje zejména od EOC, který typicky hormonální markery exprimuje [18, 19]. Recentní práce ovšem poukazují na to, že určité procento OCCC pozitivitu hormonálních markerů vykazuje – pro ER až ve 12 % případů, pro PR v 10 % případů [13, 15]. Exprese p53 vykazuje typicky tzv. divoký („wild type“) vzorec, na rozdíl od aberantního (mutovaného) vzorce typického pro HGSC. Užitečným markerem je také ARID1A, který u OCCC (vzhledem k vysoké frekvenci mutací genu *ARID1A* u těchto nádorů) vykazuje až v 55 % ztrátu exprese. Žádná z uvedených protilátek ovšem nemá 100% specificitu pro diagnózu OCCC, a nádory mohou vykazovat překryvný imunofenotyp a aberantní výsledky imunohistochemického vyšetření. V rutinní

praxi je tak důležité pracovat s využitím širších panelů imunohistochemických protilátek, kdy správná interpretace výsledků také musí brát v potaz rozsah a intenzitu zastižené exprese (důležité je to například u HNF1B, jehož exprese se může vyskytovat i u HGSC a EOC, často je však u těchto nádorů méně intenzivní). V některých případech ovšem není dosažení správné diagnózy možné ani při použití panelu protilátek, a v rámci diagnostického procesu je v těchto případech možné využít molekulárního testování.

Molekulární aberace přítomné u CCC ovaria byly popsány v několika studiích, které jsou ovšem často z různých důvodů limitované [20-24]. Hlavní problém představují zejména inherentní charakteristiky OCCC – jedná se o vzácný typ karcinomu, který navíc vykazuje značný morfologický a v některých případech i imunohistochemický překryv s jinými nádory ovaria, zejména s HGSC. Zejména starší studie provedené na kohortách bez dostatečného imunohistochemického vyšetření jsou tak pravděpodobně vstupně zatížené diagnostickou záměnou za jiný typ karcinomu. Hlavní popsané alterace u OCCC zahrnují zejména mutace v genech *ARID1A* a *PIK3CA* (obě přes 50 % případů), nicméně komplexní molekulárně genetické analýzy provedené s využitím širokého panelu genů na dostatečně velkém, diagnosticky striktně definovaném souboru OCCC v literatuře doposud chyběla [25].

Imunohistochemické a molekulárně genetické vyšetření má ovšem důležitý význam nejen z hlediska diferenciální diagnostiky, ale také z hlediska jejich prediktivního uplatnění. Jak je diskutováno níže, OCCC představuje nádor s agresivním chováním a v pokročilých stádiích s nepříznivou prognózou, kdy je ovšem v současné době spektrum možností cílené terapie značně limitované. Identifikace nových biomarkerů tak představuje aktuální a důležitý problém, vzhledem k tomu, že OCCC jsou obecně rezistentní k chemoterapii platinovými deriváty a možnosti systémové léčby pokročilých či rekurentních nádorů jsou poměrně omezené.

Naše studie zaměřené na komplexní analýzu tohoto vzácného karcinomu ovaria by se daly na základě využitých metod a oblasti zájmu volně seskupit do několika okruhů:

I. primárně imunohistochemické analýzy provedené za účelem diferenciálně diagnostickým a prognostickým, jejichž cílem byla charakterizace exprese dosud nepopsaných protilátek (markery neuroendokrinní diferenciace - synaptofyzin, chromogranin, CD56 a INSM1; a PRAME) a analýza jejich možného vztahu s prognózou/klinicko-patologickými charakteristikami zahrnutých OCCC [26, 27]
II. kombinované imunohistochemické a molekulárně-genetické analýzy provedené primárně za účelem prediktivním (ačkoliv součástí provedených analýz byly také

prognostické faktory – analýzy přežití), kam spadá zejména práce zaměřená na charakteristiku stavu HER2 u OCCC a mikrosatelitové instability [28, 29]

III. primárně molekulárně-genetické analýzy, jejichž cílem byla komplexní charakteristika velké kohorty OCCC s důrazem na genomickou a transkriptomovou analýzu, která představuje jednu z největších, jednoznačně definovaných studovaných sérií [30]

2. Imunohistochemická analýza OCCC za účelem diferenciálně diagnostickým a prognostickým

Jak je patrné ze spektra lézí se světlobuněčnou morfologií popsaného v úvodu, diferenciální diagnostika CCC ovaria je poměrně široká. V rutinní praxi je nejdůležitější jednotkou z hlediska diferenciální diagnostiky high grade serózní karcinom, který často vykazuje různý rozsah světlobuněčné přeměny buď primárně, případně jako změnu následující po chemoterapii. HGSC a OCCC se od sebe nicméně významně liší nejen molekulárně genetickou podstatou a prognózou, ale zejména vykazují odlišnou chemosenzitivitu k platinovým derivátům (které představují základní kámen systémové léčby HGSC) a OCCC tedy vyžadují odlišný terapeutický přístup.

Ačkoliv morfologie hodnocená v základním barvení hematoxylin-eosinem představuje zásadní aspekt v dosažení správné diagnózy, není sama o sobě v některých případech dostatečně specifická. HGSC kromě světlobuněčné přeměny může také vykazovat tzv. hobnail morfologii nádorových buněk (typickou pro CCC) a jeho architektonika je často také papilární či tubulocystická, díky čemuž může OCCC poměrně věrně napodobovat. Skutečnost, že diagnóza OCCC založená pouze na morfologii není sama o sobě ve všech případech dostatečná představuje problém zejména v retrospektivních studiích (především těch, které byly publikované před rokem 2013-2014, než vyšla předposlední WHO klasifikace nádorů ženského genitálu, a než se v rutinní diagnostice více rozšířila praxe ověřování histotypu nádoru imunohistochemickými metodami). Nesprávná interpretace morfologických rysů nádoru a inkonzistentní využití morfologických kritérií vede k výrazné intra- a interobservační variabilitě, a významně snižuje reprodukovatelnost diagnózy [31]. Pravděpodobnost stanovení správné diagnózy OCCC se výrazně zvyšuje při použití imunohistochemických metod, což bylo demonstrováno na řadě publikovaných retrospektivních studiích zaměřených na centrální čtení a re-klasifikaci původně „historicky“ diagnostikovaných karcinomů ovaria [32]. Jedna z největších prací, která se zabývala problematikou imunohistochemického vyšetření ovariálních karcinomů použila panel 8

protilátek (WT1, p53, p16, HNF1B, PR, TFF3, ARID1A, a vimentin) na souboru celkem 1626 případů, kdy byl histologický podtyp studovaných karcinomů potvrzen u 93,5 % nádorů, zatímco 6 % nádorů bylo reklasifikovaných na jiný histotyp [33]. Po další sérii prací od stejných autorů byl validován redukovaný panel 4 protilátek zahrnující WT1, napsin A, p53 a PR, který je schopný rozlišit základní histotypy ovariálních karcinomů s téměř 90% přesností [33-35]. Navržený algoritmický přístup s využitím těchto protilátek nicméně nepokrývá všechny indikace a spektrum imunohistochemického vyšetření by vždy mělo reflektovat konkrétní situaci a zvažovanou diferenciální diagnózu. Navzdory výrazně zpřesněné diagnostice ovšem stále zůstává určité procento nádorů, jejichž diagnóza je vzhledem k morfologickému a imunohistochemickému překryvu obtížná, a to zejména v situacích, kdy daný nádor vykazuje aberantní imunofenotyp s neobvyklou expresí některých markerů. Správná diagnóza má ovšem zásadní dopad na léčbu pacientky vzhledem k tomu, že pro pokročilý HGSC nebo endometroidní karcinom ovaria je v současnosti po dokončení chemoterapie nebo debulkingové operaci v určitých případech indikována udržovací léčba PARP inhibitory [36].

2.1 Hodnocení exprese neuroendokrinních markerů u primárních světlobuněčných karcinomů ovaria

Jednou z možných vzácnějších jednotek jsou neuroendokrinní neoplázie, zejména neuroendokrinní karcinomy (malobuněčný, ale také velkobuněčný). Neuroendokrinní karcinomy mohou vykazovat variabilně světlou cytoplazmu, kdy může v některých případech docházet k morfologickému překryvu se světlobuněčným karcinomem. Diagnosticky se pro potvrzení neuroendokrinní neoplázie vyžaduje zpravidla pozitivita alespoň jednoho neuroendokrinního markeru, jako je např. synaptofyzin, chromogranin, CD56 nebo INSM1, v kombinaci s charakteristickými morfologickými znaky. Neuroendokrinní (NE) diferenciace je ale fenomén, který byl popsán u celé řady nádorů bez neuroendokrinní morfologie.
V literatuře se exprese neuroendokrinních markerů udává zejména u basocelulárního karcinomu kůže, karcinomu prsu (především mucinózního), adrenokortikálních karcinomů, karcinomů plic, adenokarcinomů pankreatobiliárního traktu, karcinomu prostaty, ale také u karcinomů ženského genitálu (zejména mucinózního karcinomu ovaria) [37-39].
Primární neuroendokrinní nádory ovaria představují vzácné neoplázie, které tvoří méně než 1 % všech primárních maligních nádorů této oblasti [40]. Současné vydání WHO klasifikace nádorů ženského genitálního traktu rozděluje ovariální NE neoplázie na karcinoidy, malobuněčný neuroendokrinní karcinom (small cell neuroendocrine carcinoma - SCNEC), a

velkobuněčný neuroendokrinní karcinom (large cell neuroendocrine carcinoma – LCNEC) [41].

Ačkoliv jsou morfologické charakteristiky těchto lézí zpravidla dostatečně specifické pro dosažení správné diagnózy, v některých případech mohou neuroendokrinní karcinomy (NEC) vykazovat značný morfologický překryv zejména s nízce diferencovanými non-neuroendokrinními (non-NE) karcinomy ovaria. Velmi vzácně se také mohou vyskytovat případy smíšených neuroendokrinních a non-neuroendokrinních karcinomů. Diagnóza některých NEC čistě na základě morfologických znaků tak může být značně obtížná, zejména v případech s limitovaným množstvím materiálu. Na možnost chybné diagnózy poukázali mimo jiné také Veras et al. v jejich klinicko-patologické a imunohistochemické studii 11 případů „ovariálního nemalobuněčného neuroendokrinního karcinomu“ (odpovídající současné terminologii LCNEC) [42]. Z těchto 11 případů bylo 8 původně diagnostikováno jako jiné typy karcinomů („serózní cystadenokarcinom; špatně diferencovaný karcinom; středně až špatně diferencovaný cystadenokarcinom s mucinózními a endometroidními rysy; středně až špatně diferencovaný seromucinózní karcinom; a mucinózní cystadenokarcinom“), případně jako dysgerminom nebo sex cord tumory (adultní typ nádoru z buněk granulózy; nádor ze Sertoliho buněk s heterologními elementy). Vzhledem k významu, který exprese NE markerů hraje v diferenciální diagnostice těchto vysoce agresivních nádorů, mají data o expresi NE markerů u nádorů, které nejsou NE původu značný význam. Základním cílem naší práce tak byla charakteristika exprese hlavních NE markerů na velké kohortě non-NE ovariálních epiteliálních nádorů, za účelem stanovení specificity těchto markerů pro odlišení non-NE nádorů od neuroendokrinních nádorů. Součástí analýz bylo také zhodnocení možného prognostického významu exprese neuroendokrinních markerů u non-neuroendokrinních nádorů ovaria.

Celá kohorta podrobená analýzám se skládala z 551 primárních ovariálních nádorů, s celkem 121 případy světlobuněčného karcinomu. Dále bylo analyzováno také 114 HGSC, 100 low grade serózních karcinomů (LGSC), 42 případů mikropapilární varianty serózního borderline tumoru (mSBT), 52 endometroidních karcinomů ovaria (EOC), 38 případů mucinózního karcinomu (MC), a 85 případů mucinózního borderline tumoru (MBT). Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno na tkáňových mikročipech (tissue microarrays, TMA) zhotovených z parafinových bloků obsahujících nádorovou tkáň, s protilátkami proti synaptofyzinu, chromograninu, CD56 a INSM1.

Synaptofyzin byl v literatuře popsán jako marker, který je u neuroendokrinních neoplázií konzistentně exprimován nejčastěji, zatímco jako marker s nejvyšší specificitou se označuje

chromogranin. CD56 je obecně považovaný za nejméně senzitivní neuroendokrinní marker, který by se pro potvrzení NE diferenciace měl používat pouze při přítomnosti dalších histologických (morfologických) známek, které na tuto diagnózu ukazují [43]. INSM1 představuje recentně popsaný NE marker, který byl v literatuře potvrzen jako vysoce sensitivní a specifický u neuroendokrinních neoplázií zažívacího traktu, plic, a také ženského genitálu, nicméně jeho exprese u konkrétně ovariálních NE nádorů byla popsána jen na velmi limitovaném počtu studií, které dohromady zahrnovaly 8 případů neuroendokrinních karcinomů [44-49]. Charakteristika exprese INSM1 u ovariálních non-NE nádorů je v literatuře ještě vzácnější, kdy se v době publikace naší práce jednalo o jedinou studii [49]. Výsledky naší práce ukázaly, že exprese NE markerů u všech studovaných ovariálních non-neuroendokrinních nádorů byla obecně nízká, s několika výjimkami. Nejvyšší počet případů vykazujících pozitivní expresi alespoň jednoho (libovolného) NE markeru jsme zaznamenali u mucinózních nádorů, zejména MBT (53 % případů MBT vykazovalo pozitivitu INSM1, 49 % případů bylo pozitivních v chromograninu, a 28 % případů MBT exprimovalo synaptofyzin). Mucinózní nádory také vykazovaly nejvyšší rozptyl v rozsahu a intenzitě exprese NE markerů, ačkoliv tato exprese byla zpravidla omezená na non-mucinózní buňky rozptýlené mezi nádorovými mucinózními buňkami podél bazální membrány mucinózních žlázových formací (fenomén, který je v literatuře dobře známý již desítky let, a který je nejčastěji vztahován k možnému gastrointestinálnímu fenotypu mucinózního epitelu u primárních ovariálních mucinózních nádorů) [50-52]. Zajímavostí je, že žádné z mucinózních nádorů v naší kohortě nevykazovaly expresi CD56, která byla naopak zaznamenána s nejvyšší frekvencí u HGSC (26 % pozitivních případů). Celkově nejvyšší počet pozitivních případů z celé kohorty byl pozorován v případě protilátky INSM1 (pozitivní v 60/124 (48 %) všech mucinózních nádorů, ačkoliv rozsah exprese byl zpravidla limitovaný na 5 – 10 % nádorových buněk). Tento relativně nově popsaný jaderný marker tak v naší práci vykazoval největší senzitivitu, což je v souladu s literárními daty, kde je INSM1 konzistentně označován za robustní, vysoce senzitivní a specifický NE marker [53].

Světlobuněčné karcinomy vykazovaly obecně velmi nízkou expresi NE markerů, kdy 3 % případů (n = 4) exprimovala CD56, 1 % (n = 1) exprimovalo synaptofyzin, 8 % (n = 10) exprimovalo chromogranin, a 3 % případů (n = 4) exprimovala INSM1. Pokud byla exprese zastižena, jednalo se zpravidla o nejvýše fokální expresi (pozorovanou v 11 – 50 % nádorových buněk). Z hlediska diferenciální diagnostiky mezi OCCC (zejména eosinofilní variantou) a neuroendokrinními karcinomy se tak jedná o markery s vysokou rozlišovací schopností, kdy je nicméně důležité brát v potaz nejen samotnou přítomnost exprese NE

markerů, ale také její rozsah (kdy se fokální exprese, ačkoliv vzácně, může vyskytovat i u non-NE ovariálních karcinomů, jako je OCCC). Jediná další práce, která také popisuje expresi NE markerů (konkrétně CD56) u ovariálních non-NE nádorů udává „nějaký stupeň exprese“ u 54 % (6/11) světlobuněčných karcinomů, což se významně liší od námi popsaných 3 %, nicméně výsledky autorů jsou limitované malým počtem zahrnutých OCCC [54]. Celkově ovšem tento nález podporuje skutečnost, že specificita CD56 pro diagnózu neuroendokrinních neoplázií je velmi nízká. Možný prognostický význam NE markerů u CCC ovaria v naší kohortě nebylo možné (vzhledem k naprosto převažující negativitě exprese všech markerů) statisticky posoudit.

2.2 Hodnocení exprese PRAME u primárních světlobuněčných karcinomů ovaria

Dalším studovaným imunohistochemickým markerem je PRAME (Preferentially Expressed Antigen in Melanoma), který spadá do širší rodiny tzv. cancer-testis antigenů a který je selektivně exprimován u širokého spektra somatických tkání jako jsou germinální buňky, tkáň proliferačního endometria, nadledvin, a placenty [55, 56]. Abnormální exprese PRAME byla také popsána u řady maligních nádorů, kde PRAME funguje jako tumor asociovaný antigen (TAA) a zpravidla je spojován s agresivním chováním a špatnou prognózou [57, 58]. Z diagnostického hlediska má exprese PRAME význam zejména u maligních melanocytárních nádorů, neboť se jedná o vysoce selektivní a senzitivní marker maligního melanomu [59]. PRAME tak v současné době představuje užitečnou součást panelu imunohistochemických protilátek využívaných při diagnostice melanocytárních lézí. Jak je ovšem patrné, exprese PRAME se vyskytuje i u jiných malignit (a tedy není specifická pouze pro melanocytární léze), kde má spíše prognostický než diagnostický význam. Exprese PRAME je v současné době také předmětem zájmu z hlediska možného imunoterapeutického využití u celé řady různých nádorů [60-62].

O expresi PRAME v nádorech ženského genitálu je v současnosti dostupných jen velmi málo dat. V práci recentně publikované autory Lezcano et al. je exprese popsána u (mimo jiné) 20 „serózních karcinomů“ ovaria (pozitivní u 13/20 případů, 65 %) a 10 „endometriálních karcinomů“ (všechny pozitivní), bez bližší specifikace typu nádorů [63]. Kaczorowski et al. následně provedli imunohistochemickou analýzu s využitím protilátky proti PRAME u rozsáhlé kohorty více než 5800 solidních maligních nádorů, a nalezli expresi u 82 % endometriálních karcinomů (bez bližší specifikace), 82 % serózních karcinomů endometria, 60 % karcinosarkomů těla děložního, 90 % světlobuněčných karcinomů ovaria, a 63 % „serózních karcinomů“ ovaria (bez bližší specifikace) [64]. Obě uvedené práce jsou ovšem

limitované malým počtem nádorů z této konkrétní gynekopatologické oblasti, a nejednoznačnou terminologií (zejména s ohledem na ovariální karcinomy, kdy jsou v obou uvedeny pouze „serózní karcinomy“ bez rozlišení na LGSC a HGSC, které představují zcela odlišné diagnostické jednotky). Cílem naší práce tak byla charakteristika exprese PRAME na kohortě 485 primárních tubo-ovariálních nádorů, která se skládala ze 107 případů světlobuněčného karcinomu a dále 103 případů HGSC, 119 případů LGSC/mSBT, 52 případů EOC a 104 případů MC/MBT.

Naše výsledky potvrdily, že PRAME představuje relativně nespecifický imunohistochemický marker, jehož využití v chirurgické patologii je nad rámec oblasti melanocytárních lézí poměrně limitované. Nejnižší exprese byla zastižena u skupiny mucinózních nádorů [MC/MBT, pozitivní u 2/104 (2 %)] a u LGSC/mSBT [pozitivní u 4/119 (4 %)]. Naopak vysoká frekvence exprese se vyskytovala u OCCC [60/107 (56 %)], EOC [31/52 (60 %)], a HGSC [64/103 (62 %)]. Tato data sice nemají velký význam z hlediska diferenciální diagnostiky jednotlivých typů ovariálních karcinomů, představují však důležitou informaci o tom, že imunohistochemické vyšetření je spolehlivou a relativně levnou metodou pro stanovení exprese PRAME u těchto nádorů.

Z hlediska prognostického významu PRAME exprese u CCC ovaria naše analýzy přežití neprokázaly žádný statisticky významný vztah mezi expresí a celkovým přežitím (overall survival, OS) a přežitím bez rekurence nemoci (recurrence-free survival, RFS). Pro světlobuněčný karcinom ovaria naše data představují v současnosti jediná, která se touto problematikou zabývala.

Zatímco poměrně široký rozsah exprese PRAME u karcinomů ovaria i jiných lokalit komplikují jeho využití jako diagnostického markeru, tato data naopak podporují jeho možné využití jako terapeutický cíl. PRAME byl identifikován jako potenciální cíl imunoterapie u několika různých malignit. Vzhledem k tomu, že v současnosti dostupná data poukazují na obecně vysokou úroveň exprese PRAME u OCCC (56 % dle našich výsledků, v literatuře až 90 %), by se tak mohlo jednat o slibný imunoterapeutický cíl [64]. Ovariální karcinomy jsou obecně z hlediska imunoterapie považované za méně imunogenní („studené“) nádory, u kterých by se daly s lepší účinností využít metody adoptivní T-buněčné terapie s T-buněčnými receptory (TCRs) cílenými proti TAA. Exprese PRAME je navíc často asociovaná s hypometylací jeho promotoru, což koreluje s vysokou úrovní exprese tohoto proteinu [65]. Jelikož se exprese PRAME zdá být regulovaná prostřednictvím DNA metylace, mohlo by se tak jednat o vhodný cíl terapie epigenetickými modulátory jako je decitabine (inhibitor DNA metyltransferázy 5-aza-2′-deoxycytidinu), které posilují účinky imunoterapie, neboť stimulují

PRAME-specifickou imunoreaktivitu [66, 67]. Recentní výsledky ukazují, že PRAME-specifické TCRs vykazovaly u buněčných linií ovariálního karcinomu (OVCA) *in vitro* i *in vivo* potentní protinádorovou aktivitu [68]. Důležitý problém nicméně v klinické praxi stále představuje vývoj terapie, která by byla schopná efektivně cílit pouze na PRAME-exprimující nádorové buňky, s minimálním efektem na normální buňky, které PRAME exprimují také.

3. Kombinované imunohistochemické a molekulárně-genetické analýzy OCCC s primárně prediktivním významem

OCCC se typicky vyskytuje u mladších pacientek než HGSC, a často je také diagnostikován v časnějším stádiu onemocnění [69]. Zatímco prognóza nádorů diagnostikovaných v časném stádiu je relativně příznivá, nádory diagnostikované v pozdním stádiu a rekurentní onemocnění jsou charakterizovány výrazně horší prognózou s kratším celkovým přežitím, neboť CCC je typicky rezistentní ke standartní chemoterapii založené na platinových derivátech. Terapie OCCC je v současnosti v rámci doporučených postupů založená na primárním kompletním chirurgickém stagingu či radikální operaci, kdy je další terapie shodná s high grade epiteliálními karcinomy ovaria obecně [36]. Pro nádory ve II. stádiu a výše je dále bez ohledu na histologický typ indikována adjuvantní chemoterapie s kombinací paklitaxelu + CBDCA (případně alternativní režimy), kdy lze v některých případech tuto kombinaci doplnit o bevacizumab. Vzhledem k chemorezistenci OCCC je ovšem přežití pacientek s CCC ovaria v porovnání s HGSC stejného stádia výrazně kratší [70].
V porovnání s HGSC je také v současnosti dostupné spektrum možností cílené terapie pro CCC ovaria značně limitované. Zatímco pro HGSC je v indikovaných případech dostupná terapie PARP inhibitory, pro CCC ovaria je teoreticky dostupná pouze agnostická cílená terapie určená pro všechny nádory např. s mutací *BRAF*, *NTRK 1-3*, a *RET*; žádná z těchto alterací však u OCCC nepředstavuje častý nález. Další teoretickou možností je imunoterapie, a to v případě nádorů, které vykazují vysokou mutační nálož (TMB-high), případně mikrosatelitovou instabilitu (MSI).

3.1 Analýza stavu HER2 jako potenciální prediktivní biomarker pro OCCC

CCC ovaria představuje jedno z nádorových onemocnění, kde má identifikace nových potenciálních prediktivních biomarkerů značný význam. Jednou z hlavních skupin spektra

cílené terapie jsou tyrosinkinázové inhibitory a jejich signální cesty, kam spadá zejména humánní epidermální receptor 2 - HER2.
Historie a současné využití anti-HER2 terapie odráží výrazné pokroky v možnostech cílené léčby, zejména u HER2-pozitivního karcinomu prsu. Ačkoliv byl v minulosti původně HER2-pozitivní karcinom prsu asociovaný s nepříznivou prognózou, tento původně negativní prognostický faktor se naopak změnil na léčebnou výhodu, kdy anti-HER2 terapie monoklonálními protilátkami vedla k výraznému zlepšení prognózy. Obdobně bylo delší celkové přežití při využití anti-HER2 terapie popsáno u pacientů s HER2-pozitivními karcinomy gastroesofageální junkce (GEJ)/žaludku a u serózního karcinomu dělohy [71-75]. Zcela recentně byla do klinické praxe také zavedena nová metoda léčby založená na využití kombinace (konjugátu) protilátky proti HER2 a chemoterapeutického léčiva (antibody-drug conjugate, ADC) [76]. V současnosti jsou dostupné dva ADC se schválením FDA – Trastuzumab Emtansine (T-DM1, kombinace trastuzumabu s cytotoxickým mertansinem) a Trastuzumab Deruxtecan (T-Dxd, kombinace trastuzumabu a inhibitoru topoizomerázy I) [77, 78]. Výsledky prvních studií u karcinomu prsu ukázaly, že při využití T-Dxd na tuto terapii odpovídají nejen nádory HER2-pozitivní, ale i nádory, které vykazují jen nízkou úroveň imunohistochemické pozitivity HER2 (označované jako HER2-low) [79-82]. Recentně jde i o nádory dříve hodnocené jako zcela negativní, v současné době spadající do kategorie HER2-ultralow. Do skupiny HER2-low nádorů patří ty, které při imunohistochemickém vyšetření vykazují buď skóre 1+, nebo skóre 2+ s následným negativním vyšetřením FISH (tedy bez průkazu amplifikace HER2). Do skupiny HER2-ultralow spadají nádory hodnocené jako skóre 0, které vykazují jakoukoliv pozitivitu HER2. Tím se otevřely nové terapeutické možnosti i pacientům s nádory, u kterých by klasická anti-HER2 léčba s využitím monoklonálních protilátek nebyla indikovaná.

OCCC patří mezi nádory, kde o stavu HER2 není v literatuře dostupných mnoho dat, ačkoliv jsou charakteristické vlastnosti OCCC (jako chemorezistence a nepříznivá prognóza) obecně v literatuře spojovány právě s nádory, které vykazují overexpresi HER2 [76]. V době publikace naší práce se stavem HER2 u CCC ovaria zabývalo pouze několik studií, které byly zpravidla provedené jen na velmi malých kohortách, a ne vždy se stejnou metodologií ohledně způsobu hodnocení exprese HER2 [8, 83-88]. Ve většině prací se navíc jednalo pouze o hodnocení přítomnosti amplifikace HER2, bez informací o mutačním stavu genu *HER2*. Vzhledem k možným terapeutickým následkům a potřebě nových cílů léčby OCCC se přitom jedná o důležitou oblast zájmu. Hlavním cílem naší práce tak byla charakterizace stavu HER2

u CCC ovaria s využitím imunohistochemie a FISH, analýza vztahu mezi stavem HER2 a vybranými klinicko-patologickými parametry, analýza vztahu mezi stavem HER2 a prognózou, a také analýza genu *HER2* na DNA a RNA úrovni. Vzhledem k zavedení ADC jsme při hodnocení stavu HER2 pracovali i s novou kategorií HER2-low nádorů (popsanou výše) a tzv. HER2-zero nádorů (nádory se skóre 0 při imunohistochemickém vyšetření).
Na kohortě 118 CCC ovaria jsme tak identifikovali 5 % (6/118) HER2-pozitivních případů, zatímco 95 % (112/118) nádorů bylo dle klasického paradigmatu klasifikováno jako HER2-negativní. Ve skupině HER2-negativních nádorů bylo dále 75 % (84/112) nádorů klasifikovaných jako HER2-zero, a 25 % (28/112) nádorů jako HER2-low. Literární údaje o stavu HER2 u CCC ovaria udávají HER2-pozitivní OCCC v rozpětí od 0 do téměř 46 %, což poukazuje na značnou variabilitu ve výsledcích a nespolehlivost těchto dat. Zároveň poukazují na další problém, kterým je nejednotná metodika hodnocení, a v některých případech chybějící potvrzení amplifikace HER2 pomocí FISH. Naše data, získaná na pečlivě vyselektované kohortě CCC ovaria a s využitím současného standardu metodiky, tak významně přispívají k závěru, že cílená anti-HER2 terapie by mohla být u malé části těchto nádorů přínosná, zejména v případě metastatického a/nebo rekurentního onemocnění.
Recentně byla publikována kazuistika o mimořádné léčebné odpovědi na T-Dxd u pacientky s OCCC ve stádiu IIIC, který vykazoval overexpresi HER2 (při využití skórovacího systému používaného pro karcinom gastroesofageální junkce a žaludku publikovaného CAP) [89]. Významný klinický přínos terapie T-Dxd byl také popsán v rámci výsledků DESTINY-PanTumor 02 studie, která demonstrovala nejvyšší míru objektivní odpovědi na léčbu právě u karcinomů endometria, cervixu a karcinomů ovaria (nicméně bez dostupných dat o typu nádorů zahrnutých mezi „karcinomy ovaria“) [90]. Naše práce zároveň představuje také první, která se zabývala stavem HER2 v kontextu nové klasifikace využívající kategorii HER2-low nádorů.
Vzhledem k potenciálnímu významu anti-HER2 terapie u OCCC představuje volba vhodného biomarkeru důležitý problém. Jak již bylo zmíněno výše, řada dostupných dat o stavu HER2 u OCCC je limitovaná rozdílnou metodikou skórování výsledků imunohistochemického vyšetření HER2 – jak z ohledu přístupu k případům se skóre 2+/3+ (potvrzení metodou FISH či nikoliv), tak z hlediska samotného skórovacího systému (systém pro hodnocení u karcinomu prsu, versus u karcinomu GEJ/žaludku). V současné době není ohledně vhodného skórovacího systému jednoznačně doporučený konsensus. Hodnocení HER2 exprese pomocí imunohistochemie také může být ovlivněné nádorovou heterogenitou, která se zdá být více významná u nádorů jiných lokalit mimo karcinom prsu, včetně OCCC [91]. V souvislosti

s tím jsme se v naší práci zabývali otázkou, jak koreluje IHC skóre s expresí genu HER2 (zejména s ohledem na HER2-zero a HER2-low CCC ovaria). Zatímco při porovnání HER2-pozitivních a HER2-negativních (HER2-zero a HER2-low) případů byla pozorována silná korelace mezi expresí HER2 genu a HER2 stavem hodnoceným imunohistochemicky, při analýze pouze negativních případů nebyl zastižen statisticky významný rozdíl v expresi genu HER2 mezi skupinami HER2-zero a HER2-low. Pro klasifikaci CCC ovaria na HER2-low a HER2-zero případy se tak expresní analýza nezdá být vhodným nástrojem, což by potvrzovalo vyšší vhodnost imunohistochemického vyšetření. Nicméně vzhledem k určitým nevýhodám imunohistochemie zmíněným výše je možné, že genová expresní analýza by mohla představovat citlivější nástroj pro klasifikaci HER2-negativních CCC ovaria, pokud by byla provedená s využitím citlivějších metod (jako jsou například mRNA analýzy).

Další otázkou byl také vztah HER2 stavu a klinicko-patologických charakteristik OCCC, respektive prognózy pacientek s tímto onemocněním. Pro OCCC jsou literární data o prognostickém významu HER2 stavu poměrně chudá, a poskytují nejednoznačné závěry. V literatuře jsou popsány dvě studie, které udávají, že zvýšená exprese HER2 je negativním prognostickým markerem a je spojená s horšími parametry přežití, nicméně obě jsou limitované buď velmi malým počtem OCCC zahrnutých v kohortě, případně pracovaly s heterogenní skupinou karcinomu ovaria bez bližší specifikace konkrétního histotypu [83, 92]. Jiní autoři naopak došli k závěru, že zvýšená exprese HER2 nemá na prognózu statisticky významný vliv, a jako nezávislý prognostický faktor se tak HER2 stav u OCCC neuplatňuje [87, 93]. Naše data tak představují důležitý přínos do této problematiky, kdy naše výsledky ukázaly, že při využití 3-stupňové klasifikace (HER2-zero, HER2-low, a HER2-pozitivní nádory) nevykazuje přežití pacientek statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Jistou limitaci v tomto ohledu představuje poměrně nízký počet případů ve skupině HER2-pozitivních nádorů; při analýze pouze mezi skupinou HER2-zero a HER2-low nádorů vykazovaly pacientky s HER2-zero nádory významně delší OS i RFS. Tento vztah nicméně ztratil statistickou významnost při využití multivariantních analýz, a k jeho jednoznačnému potvrzení jsou do budoucna zapotřebí další data pocházející z větších kohort. Dostupnost těchto dat je ovšem limitována skutečností, že OCCC představují poměrně vzácnou jednotku.

3.2 Analýza mikrosatelitového stavu CCC ovaria a její význam

Samostatnou kapitolu z hlediska prediktivních biomarkerů tvoří problematika mikrosatelitové instability, která představuje biomarker pro imunoterapii. Kromě významu pro prediktivní

testování má hodnocení mikrosatelitové instability důležitý význam také jako screeningová metoda pro Lynchův syndrom, charakterizovaný zejména karcinomy tlustého střeva a ženského genitálu (především karcinomy endometria, ale také karcinomy ovaria – endometroidní karcinom a světlobuněčný karcinom).

Znalosti o nádorovém mikroprostředí OCCC s ohledem na možné využití imunoterapie jsou stále do jisté míry limitované vzácným výskytem tohoto nádoru, nicméně dostupná data ukazují, že mikroprostředí OCCC je z hlediska infiltrace imunitními buňkami značně heterogenní, s kombinací oblastí s ložiskovou infiltrací T-lymfocyty a naopak oblastí, které jsou tzv. immune-excluded [94]. Tato heterogenita a variabilita v zastižené imunitní odpovědi se obecně považuje za důvod, proč imunoterapie zpravidla nedosahuje u karcinomů ovaria dostatečně dobré léčebné odpovědi. Na rozdíl od pouze fokální a heterogenní imunitní infiltrace popsané u OCCC je celkově výrazně silnější imunitní odpověď udávaná u HGSC. Recentně publikovaná práce zaměřená na nádorové mikroprostředí OCCC popsala výraznou variabilitu ve frekvenci a fenotypu zastižených buněk imunitního systému, expresi checkpoint molekul, a v množství kolagenní matrix mezi nádorovými buňkami, invazivním okrajem nádoru a nádorovým stromatem [95]. OCCC v této studii vykazovaly pouze nízkou expresi PD-1 a PD-L1, kdy autoři ovšem udávají vysokou expresi PD-L2 na nádorových buňkách, což by mohlo představovat jeden z mechanismů, jakým se CCC ovaria vyhýbají T-lymfocyty zprostředkované destrukci. Zajímavostí je také fakt, že zastižené populace imunitního systému a rozsah a složení kolagenní matrix se významně lišily mezi OCCC s mutací *ARID1A* a OCCC, které byly *ARID1A* wild type. *ARID1A*-mutované OCCC by tak teoreticky mohly lépe odpovídat na terapii checkpoint inhibitory, neboť tyto nádory vykazovaly v popsané studii více negativních asociací mezi PD-1 signální kaskádou a buňkami imunitního systému, kdy je přerušení této kaskády spojené s vyšší pravděpodobností vzniku protinádorové odpovědi imunitního systému.

Navzdory limitovanému množství dat o nádorovém mikroprostředí OCCC se ovšem ukazuje, že imunoterapie s využitím checkpoint inhibitorů by mohla být slibnou terapeutickou možností alespoň u části pacientek s OCCC, kdy recentní studie popsala, že 25 % (4/16) pacientek v jejich sérii vykazovalo při léčbě PD-1/PD-L1 inhibitory trvalou klinickou odpověď [96]. Celkem 12 případů v této studii bylo podrobeno komplexnímu molekulárnímu testování nádorové tkáně, kdy všechny nádory byly mikrosatelitově stabilní (MSS) a téměř všechny (s výjimkou jednoho případu) vykazovaly nízkou mutační nálož (TMB-low). Ze 4 případů s klinickou odpovědí na terapii vykazovaly 2 případy „hojné množství tumor infiltrujících lymfocytů exprimujících PD-1, které bylo hodnocené pomocí

imunofluorescence. Dostupná data tak poukazují na to, že terapie checkpoint inhibitory by mohla hrát roli u OCCC, nicméně klíčovým faktorem pro správnou indikaci (a účinnost) této terapie představuje volba vhodných prediktivních biomarkerů, které pro OCCC v současné době jednoznačně definované nejsou.

V současnosti jsou v klinické praxi dostupné celkem 3 prediktivní biomarkery pro imunoterapii se schválením FDA, kam společně s expresí PD-1/PD-L1 patří také TMB a mikrosatelitová instabilita (MSI). Mikrosatelitová instabilita (respektive deficience MMR proteinů hodnocená imunohistochemicky, MMRd) se uplatňuje jako biomarker pro léčbu pembrolizumabem bez ohledu na typ nádoru, a představuje tak první případ, kdy FDA schválila protinádorovou terapii čistě na základě genetického profilu nádoru (tkáňově agnostický biomarker) [97]. Samostatnou problematiku představuje otázka způsobu hodnocení mikrosatelitové instability, kdy hlavní dostupné metody testování zahrnují imunohistochemické vyšetření (hodnocení exprese všech 4 MMR proteinů - MSH2, MSH6, PMS2, MLH1; při ztrátě exprese je nádor hodnocen jako MMRd), PCR s následnou fragmentační analýzou (PCR-FA, hodnocení délky mikrosatelitů; při prokázané instabilitě je nádor hodnocen jako MSI-High), a vyšetření stavu mikrosatelitů metodou NGS vyšetření. Vzhledem k tomu, že literárně udávaná senzitivita jednotlivých metod je srovnatelná (přibližně 90 %), jako metodu první volby doporučuje European Society for Medical Oncology (ESMO) imunohistochemické vyšetření [98-101]. Dle některých studií se ovšem udává, že diskrepance mezi MMRd a MSI-High stavem je v závislosti na typu daného nádoru až 10 – 15 %, kdy tedy existuje malé procento MMRd nádorů, které nejsou MSI-High, a naopak [102, 103]. Cílem naší práce tak bylo nejen komplexní zhodnocení frekvence MMRd/MSI-High stavu u OCCC, ale také porovnání dostupných metod hodnocení (IHC versus PCR-FA a NGS testování).

Dle dostupných dat je MSI (respektive MSI-High stav) u OCCC relativně vzácný, kdy se udává v rozpětí od 0 % do nejvýše 25 % případů [22, 104-110]. Výsledky publikovaných studií jsou ovšem do jisté míry limitované menším rozsahem studovaných sestav (do 50 případů). V naší kohortě 100 OCCC bylo imunohistochemickým vyšetřením identifikováno 7 MMRd případů, což je při frekvenci 7 % výsledek rámcově shodný s publikovanými daty. Při hodnocení pomocí PCR-FA bylo z těchto 7 případů 6 hodnoceno jako MSI-High, a 1 jako MSS. Všech 7 případů vykazovalo při vyšetření metodou NGS mikrosatelitovou instabilitu a také mutaci v jednom z MMR genů, přičemž v 5 případech se jednalo o mutace somatické a ve 2 případech o mutace germinální (v našem souboru tak 2 % pacientek mělo nádor spojený s Lynchovým syndromem). K těmto 7 případům byla dále v mutační analýze zastižena

somatická mutace u dalších 3 OCCC, které byly hodnocené jako MMR-proficientní (IHC) a mikrosatelitově stabilní (PCR-FA a NGS). Shoda mezi hodnocením MSI s využitím metody IHC, PCR-FA a NGS (panel 53 lokusů, viz níže) byla v naší práci vynikající (kappa = 0.949). Diskrepanci mezi IHC a PCR-FA testováním jsme zaznamenali pouze u jednoho případu, který měl somatickou mutaci *MSH6* a vykazoval MMRd stav imunohistochemicky, ale při vyšetření PCR-FA byl falešně negativní. Tento výsledek je v souladu s již popsanými daty, která udávají, že u *MSH6* mutovaných nádorů mohou být výsledky MSI testování falešně negativní až v polovině případů [111].

Výsledky analýzy založené na NGS ukázaly, že panel standardně používaný pro hodnocení MSI u kolorektálního karcinomu (s hodnocením 17 mikrosatelitových lokusů) má horší výsledky než námi navržený panel založený na hodnocení 53 vybraných mikrosatelitových lokusů (senzitivita 1 a specificita 0,97 při cut-off hranici 18 % nestabilních lokusů pro panel 17 lokusů, v porovnání se senzitivitou 1 a specificitou 1 při cut-off hranici 23 % nestabilních lokusů pro panel 53 lokusů). Tato data naznačují, že mikrosatelitové lokusy se nejspíše liší v závislosti na typu tkáně a nádoru, kdy odlišné nádory mohou vykazovat preferenčně mutace v jiných mikrosatelitových lokusech a pro přístup k MSI testování založený na NGS analýze by tak měly být využívány tkáňově specifické lokusy. Pro praktické využití NGS MSI testování je tak do budoucna klíčová validace specifického panelu mikrosatelitových lokusů pro karcinomy ovaria.

Ačkoliv je MSI u OCCC vzácná, její přítomnost může být vodítkem při rozhodování o léčbě, zejména při použití imunoterapie. Nízká prevalence a nejednoznačné prognostické důsledky však zdůrazňují potřebu dalšího výzkumu s cílem optimalizovat léčebné strategie pro pacienty s OCCC. Pochopení molekulárního prostředí OCCC, včetně MSI a dalších genomických změn, je nezbytné pro pokrok v personalizované medicíně u tohoto terapeuticky problematického podtypu nádorů. Zároveň naše data podporují závěr, že nejen pacientky s endometroidním karcinomem ovaria, ale i pacientky s OCCC by měly být zařazeny do algoritmů zaměřených na screening Lynchova syndromu.

4. Molekulárně-genetická analýza CCC ovaria s ohledem na charakteristiku spektra aberací a jejich diagnostický, prognostický a prediktivní význam

Jak bylo popsáno výše, molekulární data pocházející zejména ze starších studií jsou do jisté míry nejspíše limitovaná zařazením jiných histologických typů nádorů do analyzovaných souborů. V rámci molekulárně-genetických analýz další limitace spočívají v metodologii a použitém přístupu k analýze, kdy byl často v panelu zahrnutý pouze malý počet genů, a kdy

se citlivost jednotlivých použitých metod může lišit díky nízkému pokrytí studovaných oblastí genomu.

Spektrum molekulárních aberací u OCCC má přitom důležitý diagnostický, prognostický, a zejména v současnosti neustále narůstající prediktivní význam. Naše práce se tak soustředila na komplexní genomickou a transkriptomovou analýzu kohorty 113 OCCC, která představuje jednu z největších, jednoznačně definovaných studovaných sérií. Celá kohorta byla podrobena DNA NGS analýze se širokým panelem 727 genů/částí genů (za účelem stanovení mutačního spektra, TMB a mikrosatelitové instability), RNA NGS analýze s panelem 147 genů a expresnímu profilování s následným hierarchickým klastrováním. Naše práce tak představuje první takto komplexní molekulární analýzu OCCC provedenou na případech, které splňují přísná diagnostická kritéria.

Naše výsledky ukázaly, že nejčastější aberace u OCCC představují mutace v genech *ARID1A* (51 %), *PIK3CA* (47 %), promotoru *TERT* (27 %), *KRAS* (18 %), *TP53* (13 %), *ATM* (10 %), *PPP2R1A* (7 %), *NF1* (6 %), *PTEN* (6 %), a *POLE* (4 %). Z hlediska genových mutací jsou tak naše výsledky v souladu s dostupnými literárními daty a potvrzují, že alterace charakteristické pro OCCC zahrnují zejména mutace genu *ARID1A* a genů v signální cestě PIK3CA/Akt/mTOR. Tyto alterace jsou základními genetickými změnami, které jsou zodpovědné za biologické chování OCCC, a které se v našem souboru často vyskytovaly společně s mutacemi v genech *PIK3R1* a *KRAS* souběžně v různých kombinacích. Vzájemná kombinace mutací *ARID1A* a *PIK3CA* (také označována jako „double-hit“ podtyp OCCC) byla také recentně popsána v jiné studii, ačkoliv na menší kohortě [107]. Tyto výsledky se ovšem liší od jedné z dalších publikovaných studií, jejíž autoři udávají, že somatické mutace v genech *ARID1A, PIK3CA, PIK3R1* a *TP53* se vzájemně vylučovaly [112]. Autoři této studie zároveň provedli také klastrovací analýzu (na základě kombinace mutací v driver genech a RNA expresních dat) a popsali, že tím v jejich kohortě vznikly 2 hlavní klastry – první, charakterizovaný *ARID1A* mutacemi se zvýšenou expresí genů charakteristických pro OCCC zodpovědných za chemorezistenci (*ANXA4* a *GPX3*) či asociaci s endometriózou (*EEF1A2*); a druhý, charakterizovaný z velké většiny nádory s *TP53* mutacemi a zvýšenou expresí genů podílejících se organizaci extracelulární matrix a mezenchymální diferenciaci (*ADGR2* a *PDCH19*). První klastr autoři nazvali jako „klasický OCCC“ a druhý jako „HGSC-like“, nicméně sami následně uvádí, že charakteristiky nádorů spadajících do HGSC-like klastru v jejich kohortě (včetně iniciální dobré odpovědi na chemoterapii platinovými deriváty) nebyly typické pro CCC ovaria, což vedlo k přehodnocení těchto případů. Na základě opakovaného zhodnocení morfologických charakteristik nádorů v této skupině a dodatečného

imunohistochemického vyšetření v případech, u kterých byl stále dostupný materiál, byly následně 4/14 (28 %) *TP53*-mutovaných nádorů překlasifikovány na jinou diagnózu (3 EOC a 1 HGSC). Celkově tak autoři odhadují, že 19 ze všech 71 *TP53*-mutovaných OCCC v jejich kohortě bylo původně špatně klasifikováno, což dále podtrhuje nespolehlivost části literárních dat zaměřených na CCC ovaria. V porovnání s těmito výsledky hierarchická klastrovací analýza v naší práci také odhalila přítomnost dvou klastrů v naší kohortě OCCC, které ovšem byly charakterizovány rozdílnou expresí odlišných genů, než bylo dosud v literatuře popsáno. Klastr 1 tak obsahoval 93 případů s velmi heterogenním vzorcem exprese, zatímco klastr 2 obsahoval 12 případů s nápadně vyšší expresí genů *AKT3, DDR2, CTNNB1, JAK2, KIT* a *PDGFRA*, a naopak nižší expresí genů *CDH1, ERBB2, ERBB3, FGFR3, HIST1H3B, HNF1B* a *POLQ* v porovnání s prvním klastrem.

Nad rámec výše uvedených nejčastějších mutací byly v naší práci dále zastiženy také méně časté mutace v genech *ARHGAP35, ARID1B, CREBBP, PIK3R1, RASA1, SHPRH* (každý 5 %), a *LATS1, MLL2*, a *SETX* (každý 4 %). Znalost molekulárního profilu charakteristického pro OCCC je důležitá nejen z hlediska prediktivního, ale i diferenciálně diagnostického. Ačkoliv je imunohistochemické vyšetření v kombinaci s pečlivým zhodnocením morfologie ve většině případů schopné spolehlivě odlišit OCCC od jeho nejčastějšího „napodobovatele“ HGSC, malá část případů může vykazovat výrazný překryv těchto charakteristik. Problematické tak jsou zejména případy OCCC, které nevykazují pozitivitu markerů světlobuněčné diferenciace (zejména napsinu A) a případy HGSC, které vykazují wild type vzorec exprese p53 [33].

Na rozdíl od OCCC, hlavní alterace typické pro HGSC jsou zejména mutace genu *TP53*, které jsou pro HGSC prakticky definující a které se v rutinní diagnostické praxi ověřují na imunohistochemické úrovni s využitím protilátky p53. Dle literatury ovšem až 2,2 % HGSC může vykazovat wild type (a ne aberantní) vzorec exprese p53 způsobený nejspíše mutacemi v genu *TP53*, které nevedou k abnormální IHC expresi, jako jsou některé trunkační nebo sestřihové mutace [33]. Tento fenomén může, zejména při využití pouze limitovaného IHC panelu, velmi snadno vést k chybné diagnóze a záměně HGSC za OCCC (případně i za EOC). V těchto případech pak může molekulární testování významně napomoci k dosažení správné diagnózy. Odlišení OCCC od jiných karcinomů ovaria ovšem není možné pouze na základě jediné (dostatečně specifické) alterace, ale je nutné jej dosáhnout na základě hodnocení celkového mutačního profilu daného nádoru s přihlédnutím k celému spektru identifikovaných mutací. Mimo mutace *TP53* (vyskytující se v 98 - 100 %) další alterace typické pro HGSC zahrnují mutace genů *BRCA1/2* (kdy jsou germinální mutace v těchto

genech zodpovědné za 5 – 10 % ovariálních karcinomů) a dalších genů účastnících se opravných mechanismů homologní rekombinace jako je *RAD51, CHEK2,* a *PALB2* [113-115]. Navzdory vysoké frekvenci mutací *TP53* u HGSC se ovšem nejedná o alteraci, která by se u karcinomů ovaria vyskytovala výlučně u HGSC. V naší práci jsme mutace *TP53* zaznamenali ve 13 % OCCC, přičemž mutace *TP53* se vzájemně vylučovaly s mutacemi v genu *KRAS,* které byly navíc častější u nádorů v časnějším stádiu. Mutace v genech *BRCA1/2* byly u naší kohorty OCCC velmi vzácné (1 % / 2 % případů). Recentní práce, která se zabývala klasifikací OCCC do 4 podtypů na základě molekulárních podtypů definovaných TCGA pro karcinom endometria (*POLE* mutovaný, MMR-deficientní, p53 abnormální, a nádory s nespecifickým molekulárním profilem - NSMP) uvedla, že 20 % OCCC v jejich sérii vykazovalo *TP53* mutace/p53 abnormální profil [110]. To představuje důležitou informaci z hlediska diferenciální diagnostiky, kdy je důležité být si vědom výskytu těchto alterací i u OCCC.

Z prognostického hlediska při použití stejné molekulární klasifikace spadalo v naší kohortě 76 % nádorů do skupiny NSMP tumorů, 13 % do skupiny p53 abnormální, 7 % do skupiny MMR-deficientní, a 4 % do skupiny *POLE* mutovaných nádorů. V souladu s literárními daty vykazovaly *POLE* mutované OCCC lepší přežití (s delším RFS), ale pouze v univariantní analýze – při použití multivariantního přístupu tyto výsledky ztratily statistický význam, kdy byla naopak jako nezávislý a nejsilnější prognostický faktor identifikována radikalita chirurgického výkonu (R0 resekce).

Výsledky RNA NGS analýzy ukázaly, že v našem souboru CCC ovaria byly genové fúze přítomné u 13 % (14/105) případů, kdy u 36 % případů s fúzí byl jedním z fúzních partnerů gen pro tyrosinkinázové receptory, což by mohlo mít důležitý význam z hlediska prediktivního testování. Z celkem 13 detekovaných fúzí bylo 6 fúzí nových, dosud nepopsaných (*LAMB1::MET, CCDC3::AKT3, NBN::CNGB3, DHX15::ATR, LGALS3::EZH2,* a *ARID1A::MIA2*), zatímco zbývajících 7 fúzí představuje alterace již popsané. Sem patří fúze *TFG::ADGRG7*, fúze genu *MET* s různými fúzními partnery (*ST7::MET, CAPZA2::MET,* a *LAMB1::MET*), fúze *ERBB4::IKZF2*, a fúze *ESR1::ARMT1*.

Naše výsledky tak potvrzují, že OCCC je nádor charakterizovaný poměrně heterogenním molekulárním profilem. V současné době je celá řada z námi detekovaných alterací spojená s možnostmi cílené léčby – OCCC s mutacemi *PIK3CA* by mohly odpovídat na léčbu PI3K- nebo m-TOR inhibitory, zatímco nádory s *ARID1A* mutacemi by mohly být vhodné pro léčbu PARP inhibitory či HDAC inhibitory, jako například pan-HDAC inhibitor suberoylanilid

hydroxamin (SAHA, vorinostat) [116, 117]. Řada alterovaných genů navíc patří mezi geny kódující tyrosinkinázové receptory, pro které je v současné době dle databáze OncoKB dostupná terapie – zejména *KIT* (imatinib, regorafenib), *PDGFRA* (avapritinib), a *MET* (tepotinib, capmatinib). Výsledky DNA NGS analýzy také ukázaly, že 9 % OCCC v naší sérii dosahovalo vysoké mutační nálože (klasifikováno jako TMB-High při použití cut-off hranice 10 mutací/megabázi) a 7 % OCCC bylo mikrosatelitově instabilních (MSI-High). Oba tyto parametry se uplatňují jako prediktivní markery pro případnou imunoterapii, jejíž problematika byla již diskutována výše (část 3.2). Z terapeutického hlediska jsou důležitá také data, která ukazují, že nádory s mutacemi genu *ATM* (v naší sestavě 10 % OCCC) jsou více citlivé na terapii platinovými deriváty [25].

5. Závěr

Tato práce je zaměřená na komplexní analýzu světlobuněčného karcinomu ovaria, vzácné a vysoce maligní jednotky ovariálních epiteliálních nádorů. Hlavními přínosy práce jsou nová poznání v oblasti imunohistochemické a molekulárně-genetické charakterizace těchto nádorů, včetně jejich diagnostického, prognostického a prediktivního významu. Práce je založena na celkem 5 studiích, které byly publikovány v odborných časopisech s impakt faktorem (včetně časopisů v kategorii Q1). Tyto studie byly provedené na velké kohortě OCCC, s využitím moderních metod analýzy, včetně tkáňových mikročipů, imunohistochemie a DNA a RNA NGS.

Studie zaměřené na imunohistochemickou analýzu OCCC za účelem diferenciálně diagnostickým a prognostickým potvrdily, že imunohistochemické vyšetření je klíčové pro správnou diagnózu OCCC, zejména v kombinaci s pečlivým hodnocením morfologie. Analyzovaná exprese markerů PRAME a markerů neuroendokrinní diferenciace poskytla hodnotné informace pro diferenciálně diagnostické odlišení od jiných nádorů. Studie zaměřené na prediktivní analýzy s aktuálním terapeutickým uplatněním (hodnocení HER2 stavu a mikrosatelitové instability) u OCCC přinesly unikátní data o výskytu HER2-pozitivních nádorů (5 %) a HER2-low nádorů (25 %). Tato zjištění mohou mít důležitý dopad na možnosti cílené terapie. Další analýzy identifikovaly mikrosatelitovou instabilitu (MSI) u 7 % OCCC, což podporuje využití imunoterapie u těchto pacientek a podtrhuje důležitost MSI testování pro screening Lynchova syndromu. Další oblastí výzkumu byla také rozsáhlá analýza genomického a transkriptomového profilu OCCC na největší dosud dostupné kohortě s takto detailní charakterizací. Nejčastější mutace postihovaly geny *ARID1A* (51 %), *PIK3CA*

(47 %) a *TERT* promotor (27 %). RNA analýzy odhalily nové genové fúze, včetně *LAMB1::MET* a *ERBB4::IKZF2*, které mohou představovat potenciální cíle cílené terapie. Zjištěné molekulární charakteristiky zdůrazňují heterogenitu OCCC a naznačují možnosti prediktivního testování pro personalizovanou medicínu. Výsledky naší práce také ukázaly, že molekulární klasifikace OCCC, podobně jako u karcinomu endometria, by mohla přinést hodnotné prognostické informace. *POLE*-mutované nádory vykazovaly delší přežití bez rekurence, ačkoliv klíčovým prognostickým faktorem zůstal rozsah resekce.

Hlavní přínosy práce zahrnují nová data zejména z oblasti diferenciální diagnostiky a personalizované medicíny, kdy identifikace specifických molekulárních aberací, jako jsou mutace *ARID1A*, *PIK3CA* a HER2-low status, otevírá možnosti cílené terapie a imunoterapie pro pacientky s OCCC. Práce poskytla nové poznání o expresi markerů, jako jsou PRAME a neuroendokrinní markery, což usnadňuje rozlišení OCCC od jiných nádorů. Naše výsledky také podporují rutinní testování MSI u OCCC jako součásti screeningu pro Lynchův syndrom. Zároveň naše práce otevírá řadu otázek, které vyžadují další studium. Sem patří zejména otázka validace prediktivních biomarkerů, jako je HER2-low status a nové genové fúze, na větších kohortách. Podrobnější studium molekulárních mechanismů rezistence OCCC vůči platinové chemoterapii by mohlo přispět k nalezení nových léčebných postupů. V souvislosti s terapií by další analýzy interakcí mezi OCCC a jeho mikroprostředím mohly napomoci k optimalizaci imunoterapeutické strategie. Z hlediska personalizované medicíny má význam také rozšíření poznatků o specifických alteracích, jako jsou mutace *ARID1A* a *PIK3CA*.

Celkově výsledky naší práce přinesly nová poznání v oblasti patologie světlobuněčného karcinomu ovaria a poskytly podstatný základ pro budoucí výzkum. Identifikace nových biomarkerů a pochopení molekulárního profilu těchto nádorů představují krok vpřed ke zlepšení diagnostiky, prognózy a léčby pacientek s touto vzácnou malignitou. Budoucí výzkum by měl navázat na tyto poznatky a dále rozvíjet personalizované terapeutické strategie, které mohou zlepšit prognózu pacientek s OCCC.

6. Publikace in extenso

6.1 Neuroendocrine Marker Expression in Primary Non-neuroendocrine Epithelial Tumors of the Ovary: A Study of 551 Cases

Odkaz: https://journals.lww.com/intjgynpathology/abstract/2024/03000/neuroendocrine_marker_expression_in_primary.3.aspx

6.2 Immunohistochemical expression of PRAME in 485 cases of epithelial tubo-ovarian tumors

Odkaz: https://link.springer.com/article/10.1007/s00428-023-03629-z

6.3 HER2 status as a potential predictive biomarker for ovarian clear cell carcinoma

Odkaz https://link.springer.com/article/10.1007/s00428-023-03640-4

6.4 A comprehensive molecular analysis of 113 primary ovarian clear cell carcinomas reveals common therapeutically significant aberrations

Odkaz: https://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13000-023-01358-0

6.5 Microsatellite instability in non-endometrioid ovarian epithelial tumors: a study of 400 cases comparing immunohistochemistry, PCR, and NGS based testing with mutation status of MMR genes

Odkaz: https://www.translationalres.com/article/S1931-5244(23)00089-0/fulltext

7. Seznam použité literatury

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries CA Cancer J Clin 71:209-249. doi: 10.3322/caac.21660
2. Kobel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, Gilks CB, Cheryl Brown Ovarian Cancer Outcomes Unit of the British Columbia Cancer Agency VBC (2010) Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas Int J Gynecol Pathol 29:203-211. doi: 10.1097/PGP.0b013e3181c042b6
3. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Kobel M, Harris HR, Berchuck A, Rossing MA, Schildkraut JM, Doherty JA (2019) Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage J Natl Cancer Inst 111:60-68. doi: 10.1093/jnci/djy071
4. Wang M, Bi Y, Jin Y, Zheng ZJ (2024) Global Incidence of Ovarian Cancer According to Histologic Subtype: A Population-Based Cancer Registry Study JCO Glob Oncol 10:e2300393. doi: 10.1200/GO.23.00393
5. Fadare O, Parkash V (2019) Pathology of Endometrioid and Clear Cell Carcinoma of the Ovary Surg Pathol Clin 12:529-564. doi: 10.1016/j.path.2019.01.009
6. Fadare O, Parkash V, Gwin K, Hanley KZ, Jarboe EA, Liang SX, Quick CM, Zheng W, Rawish KR, Hecht JL, Desouki MM (2013) Utility of alpha-methylacyl-coenzyme-A racemase (p504s) immunohistochemistry in distinguishing endometrial clear cell carcinomas from serous and endometrioid carcinomas Hum Pathol 44:2814-2821. doi: 10.1016/j.humpath.2013.07.033
7. Fadare O, Zhao C, Khabele D, Parkash V, Quick CM, Gwin K, Desouki MM (2015) Comparative analysis of Napsin A, alpha-methylacyl-coenzyme A racemase (AMACR, P504S), and hepatocyte nuclear factor 1 beta as diagnostic markers of ovarian clear cell carcinoma: an immunohistochemical study of 279 ovarian tumours Pathology 47:105-111. doi: 10.1097/PAT.0000000000000223
8. Iwamoto M, Nakatani Y, Fugo K, Kishimoto T, Kiyokawa T (2015) Napsin A is frequently expressed in clear cell carcinoma of the ovary and endometrium Hum Pathol 46:957-962. doi: 10.1016/j.humpath.2015.03.008

9. Kandalaft PL, Gown AM, Isacson C (2014) The lung-restricted marker napsin A is highly expressed in clear cell carcinomas of the ovary Am J Clin Pathol 142:830-836. doi: 10.1309/AJCP8WO2EOIAHSOF
10. Kao YC, Lin MC, Lin WC, Jeng YM, Mao TL (2012) Utility of hepatocyte nuclear factor-1beta as a diagnostic marker in ovarian carcinomas with clear cells Histopathology 61:760-768. doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04267.x
11. Kobel M, Kalloger SE, Carrick J, Huntsman D, Asad H, Oliva E, Ewanowich CA, Soslow RA, Gilks CB (2009) A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary Am J Surg Pathol 33:14-21. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181788546
12. Li Q, Zeng X, Cheng X, Zhang J, Ji J, Wang J, Xiong K, Qi Q, Huang W (2015) Diagnostic value of dual detection of hepatocyte nuclear factor 1 beta (HNF-1beta) and napsin A for diagnosing ovarian clear cell carcinoma Int J Clin Exp Pathol 8:8305-8310
13. Lim D, Ip PP, Cheung AN, Kiyokawa T, Oliva E (2015) Immunohistochemical Comparison of Ovarian and Uterine Endometrioid Carcinoma, Endometrioid Carcinoma With Clear Cell Change, and Clear Cell Carcinoma Am J Surg Pathol 39:1061-1069. doi: 10.1097/PAS.0000000000000436
14. Nili F, Tavakoli M, Izadi Mood N, Saffar H, Sarmadi S (2020) Napsin-A Expression, a Reliable Immunohistochemical Marker for Diagnosis of Ovarian and Endometrial Clear Cell Carcinomas Iran J Pathol 15:81-85. doi: 10.30699/ijp.2020.106598.2222
15. Rekhi B, Deodhar KK, Menon S, Maheshwari A, Bajpai J, Ghosh J, Shylasree ST, Gupta S (2018) Napsin A and WT 1 are useful immunohistochemical markers for differentiating clear cell carcinoma ovary from high-grade serous carcinoma APMIS 126:45-55. doi: 10.1111/apm.12784
16. Travaglino A, Raffone A, Arciuolo D, Santoro A, Inzani F, Di Maio A, Visiello U, Fulgione C, Guida M, Mollo A, Insabato L, Zannoni GF (2022) Diagnostic accuracy of HNF1beta, Napsin A and P504S/Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR) as markers of endometrial clear cell carcinoma Pathol Res Pract 237:154019. doi: 10.1016/j.prp.2022.154019
17. Yamashita Y (2015) Ovarian cancer: new developments in clear cell carcinoma and hopes for targeted therapy Jpn J Clin Oncol 45:405-407. doi: 10.1093/jjco/hyu221

18. DeLair D, Oliva E, Kobel M, Macias A, Gilks CB, Soslow RA (2011) Morphologic spectrum of immunohistochemically characterized clear cell carcinoma of the ovary: a study of 155 cases Am J Surg Pathol 35:36-44. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181ff400e
19. Zannoni GF, Morassi F, Prisco MG, De Stefano I, Vellone VG, Arena V, Scambia G, Gallo D (2012) Clinicopathologic and immunohistochemical features of ovarian clear cell carcinomas in comparison with type I and type II tumors Int J Gynecol Pathol 31:507-516. doi: 10.1097/PGP.0b013e3182518557
20. Friedlander ML, Russell K, Millis S, Gatalica Z, Bender R, Voss A (2016) Molecular Profiling of Clear Cell Ovarian Cancers: Identifying Potential Treatment Targets for Clinical Trials Int J Gynecol Cancer 26:648-654. doi: 10.1097/IGC.0000000000000677
21. Itamochi H, Oishi T, Oumi N, Takeuchi S, Yoshihara K, Mikami M, Yaegashi N, Terao Y, Takehara K, Ushijima K, Watari H, Aoki D, Kimura T, Nakamura T, Yokoyama Y, Kigawa J, Sugiyama T (2017) Whole-genome sequencing revealed novel prognostic biomarkers and promising targets for therapy of ovarian clear cell carcinoma Br J Cancer 117:717-724. doi: 10.1038/bjc.2017.228
22. Liu H, Zhang Z, Chen L, Pang J, Wu H, Liang Z (2021) Next-Generation Sequencing Reveals a Very Low Prevalence of Deleterious Mutations of Homologous Recombination Repair Genes and Homologous Recombination Deficiency in Ovarian Clear Cell Carcinoma Front Oncol 11:798173. doi: 10.3389/fonc.2021.798173
23. Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, Hippo Y, Nagase H (2017) Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis Gynecol Oncol 144:377-383. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.11.045
24. Sugino K, Tamura R, Nakaoka H, Yachida N, Yamaguchi M, Mori Y, Yamawaki K, Suda K, Ishiguro T, Adachi S, Isobe M, Yamaguchi M, Kashima K, Motoyama T, Inoue I, Yoshihara K, Enomoto T (2019) Germline and somatic mutations of homologous recombination-associated genes in Japanese ovarian cancer patients Sci Rep 9:17808. doi: 10.1038/s41598-019-54116-y
25. Ye S, Zhou S, Wu Y, Pei X, Jiang W, Shi W, Yang W, Zhou X, Shan B, Yang H (2023) Genomic profiling of ovarian clear cell carcinoma in Chinese patients reveals potential prognostic biomarkers for survival Ann Med 55:2218104. doi: 10.1080/07853890.2023.2218104

26. Kendall Bartu M, Nemejcova K, Michalkova R, Bui QH, Drozenova J, Fabian P, Fadare O, Hausnerova J, Laco J, Matej R, Mehes G, Safanda A, Singh N, Skapa P, Spurkova Z, Stolnicu S, Svajdler M, Lax SF, McCluggage WG, Dundr P (2024) Neuroendocrine Marker Expression in Primary Non-neuroendocrine Epithelial Tumors of the Ovary: A Study of 551 Cases Int J Gynecol Pathol 43:123-133. doi: 10.1097/PGP.0000000000000962
27. Safanda A, Kendall Bartu M, Michalkova R, Struzinska I, Drozenova J, Fabian P, Hausnerova J, Laco J, Matej R, Skapa P, Svajdler M, Spurkova Z, Mehes G, Dundr P, Nemejcova K (2023) Immunohistochemical expression of PRAME in 485 cases of epithelial tubo-ovarian tumors Virchows Arch 483:509-516. doi: 10.1007/s00428-023-03629-z
28. Hajkova N, Bartu MK, Cibula D, Drozenova J, Fabian P, Fadare O, Fruhauf F, Hausnerova J, Hojny J, Krkavcova E, Laco J, Lax SF, Matej R, Mehes G, Michalkova R, Nemejcova K, Singh N, Stolnicu S, Svajdler M, Zima T, McCluggage WG, Struzinska I, Dundr P (2023) Microsatellite instability in non-endometrioid ovarian epithelial tumors: a study of 400 cases comparing immunohistochemistry, PCR, and NGS based testing with mutation status of MMR genes Transl Res 260:61-68. doi: 10.1016/j.trsl.2023.05.004
29. Kendall Bartu M, Nemejcova K, Michalkova R, Struzinska I, Hajkova N, Hojny J, Krkavcova E, Laco J, Matej R, Drozenova J, Mehes G, Fabian P, Hausnerova J, Svajdler M, Skapa P, Cibula D, Zima T, Dundr P (2023) HER2 status as a potential predictive biomarker for ovarian clear cell carcinoma Virchows Arch 483:497-507. doi: 10.1007/s00428-023-03640-4
30. Struzinska I, Hajkova N, Hojny J, Krkavcova E, Michalkova R, Dvorak J, Nemejcova K, Matej R, Laco J, Drozenova J, Fabian P, Hausnerova J, Mehes G, Skapa P, Svajdler M, Cibula D, Fruhauf F, Bartu MK, Dundr P (2023) A comprehensive molecular analysis of 113 primary ovarian clear cell carcinomas reveals common therapeutically significant aberrations Diagn Pathol 18:72. doi: 10.1186/s13000-023-01358-0
31. Missaoui N, Salhi S, Bdioui A, Mestiri S, Abdessayed N, Mokni M, Yacoubi MT (2018) Immunohistochemical Characterization Improves the Reproducibility of the Histological Diagnosis of Ovarian Carcinoma Asian Pac J Cancer Prev 19:2545-2551. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.9.2545

32. Kommoss S, Gilks CB, du Bois A, Kommoss F (2016) Ovarian carcinoma diagnosis: the clinical impact of 15 years of change Br J Cancer 115:993-999. doi: 10.1038/bjc.2016.273
33. Kobel M, Rahimi K, Rambau PF, Naugler C, Le Page C, Meunier L, de Ladurantaye M, Lee S, Leung S, Goode EL, Ramus SJ, Carlson JW, Li X, Ewanowich CA, Kelemen LE, Vanderhyden B, Provencher D, Huntsman D, Lee CH, Gilks CB, Mes Masson AM (2016) An Immunohistochemical Algorithm for Ovarian Carcinoma Typing Int J Gynecol Pathol 35:430-441. doi: 10.1097/PGP.0000000000000274
34. Kobel M, Kang EY (2022) The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification Cancers (Basel) 14. doi: 10.3390/cancers14020416
35. Kobel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WG (2019) Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility Int J Gynecol Pathol 38 Suppl 1:S123-S131. doi: 10.1097/PGP.0000000000000488
36. Modrá kniha České onkologické společnosti (2024). 30. aktualizace. Brno: Masarykův onkologický ústav. ISBN 978-80-86793-58-0.
37. Kriegsmann K, Zgorzelski C, Muley T, Christopoulos P, Thomas M, Winter H, Eichhorn M, Eichhorn F, von Winterfeld M, Herpel E, Goeppert B, Stenzinger A, Herth FJF, Warth A, Kriegsmann M (2021) Role of Synaptophysin, Chromogranin and CD56 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung lacking morphological features of neuroendocrine differentiation: a retrospective large-scale study on 1170 tissue samples BMC Cancer 21:486. doi: 10.1186/s12885-021-08140-9
38. Moller K, Uhlig R, Gorbokon N, Dum D, Menz A, Buscheck F, Luebke AM, Hube-Magg C, Hinsch A, Hoflmayer D, Fraune C, Lebok P, Weidemann S, Lennartz M, Jacobsen F, Clauditz TS, Steurer S, Burandt E, Krech R, Krech T, Marx AH, Sauter G, Simon R, Bernreuther C, Minner S (2024) Comparison of INSM1 immunostaining with established neuroendocrine markers synaptophysin and chromogranin A in over 14,000 neuroendocrine and non-neuroendocrine tumors Mol Cell Endocrinol 581:112106. doi: 10.1016/j.mce.2023.112106
39. Uhlig R, Dum D, Gorbokon N, Menz A, Buscheck F, Luebke AM, Hube-Magg C, Hinsch A, Hoflmayer D, Fraune C, Moller K, Bernreuther C, Lebok P, Weidemann S, Lennartz M, Jacobsen F, Clauditz TS, Sauter G, Wilczak W, Steurer S, Burandt E, Krech R, Krech T, Marx AH, Simon R, Minner S (2022) Synaptophysin and

chromogranin A expression analysis in human tumors Mol Cell Endocrinol 555:111726. doi: 10.1016/j.mce.2022.111726

40. Rouzbahman M, Clarke B (2013) Neuroendocrine tumors of the gynecologic tract: select topics Semin Diagn Pathol 30:224-233. doi: 10.1053/j.semdp.2013.06.007
41. WHO Classification of Tumours Editorial Board (2020) Female genital tumors: WHO Classification of Tumors. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, Pages
42. Veras E, Deavers MT, Silva EG, Malpica A (2007) Ovarian nonsmall cell neuroendocrine carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 11 cases Am J Surg Pathol 31:774-782. doi: 10.1097/01.pas.0000213422.53750.d1
43. McCluggage WG, Kennedy K, Busam KJ (2010) An immunohistochemical study of cervical neuroendocrine carcinomas: Neoplasms that are commonly TTF1 positive and which may express CK20 and P63 Am J Surg Pathol 34:525-532. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181d1d457
44. Aldera AP, Govender D, Locketz ML, Mukhopadhyay S, McHugh K, Allende D (2020) Combined Use of INSM1 and Synaptophysin Is the Most Sensitive and Specific Panel to Detect Neuroendocrine Neoplasms in the Digestive Tract Am J Clin Pathol 154:870-871. doi: 10.1093/ajcp/aqaa164
45. Juhlin CC, Zedenius J, Hoog A (2020) Clinical Routine Application of the Second-generation Neuroendocrine Markers ISL1, INSM1, and Secretagogin in Neuroendocrine Neoplasia: Staining Outcomes and Potential Clues for Determining Tumor Origin Endocr Pathol 31:401-410. doi: 10.1007/s12022-020-09645-y
46. McHugh KE, Mukhopadhyay S, Doxtader EE, Lanigan C, Allende DS (2020) INSM1 Is a Highly Specific Marker of Neuroendocrine Differentiation in Primary Neoplasms of the Gastrointestinal Tract, Appendix, and Pancreas Am J Clin Pathol 153:811-820. doi: 10.1093/ajcp/aqaa014
47. Roy M, Buehler DG, Zhang R, Schwalbe ML, Baus RM, Salamat MS, Lloyd RV, Rosenbaum JN (2019) Expression of Insulinoma-Associated Protein 1 (INSM1) and Orthopedia Homeobox (OTP) in Tumors with Neuroendocrine Differentiation at Rare Sites Endocr Pathol 30:35-42. doi: 10.1007/s12022-018-9559-y
48. Ting CH, Wang TY, Wu PS (2021) Insulinoma-associated Protein 1 Expression and Its Diagnostic Significance in Female Genital Tract Neuroendocrine Carcinomas Int J Gynecol Pathol 40:452-459. doi: 10.1097/PGP.0000000000000722

49. Zou Q, Zhang L, Cheng Z, Guo X, Cao D (2021) INSM1 Is Less Sensitive But More Specific Than Synaptophysin in Gynecologic High-grade Neuroendocrine Carcinomas: An Immunohistochemical Study of 75 Cases With Specificity Test and Literature Review Am J Surg Pathol 45:147-159. doi: 10.1097/PAS.0000000000001641
50. Aguirre P, Scully RE, Wolfe HJ, DeLellis RA (1984) Endometrial carcinoma with argyrophil cells: a histochemical and immunohistochemical analysis Hum Pathol 15:210-217. doi: 10.1016/s0046-8177(84)80182-3
51. Bosman FT (1997) Neuroendocrine cells in non-endocrine tumors: what does it mean? Verh Dtsch Ges Pathol 81:62-72
52. Ueda G, Shimizu C, Saito J, Inoue Y, Tanaka Y, Inoue M, Tanizawa O (1989) An immunohistochemical study of neuroendocrine cells in gynecologic tumors Int J Gynaecol Obstet 29:165-172. doi: 10.1016/0020-7292(89)90848-5
53. Maleki Z, Nadella A, Nadella M, Patel G, Patel S, Kholova I (2021) INSM1, a Novel Biomarker for Detection of Neuroendocrine Neoplasms: Cytopathologists' View Diagnostics (Basel) 11. doi: 10.3390/diagnostics11122172
54. Bosmuller HC, Wagner P, Pham DL, Fischer AK, Greif K, Beschorner C, Sipos B, Fend F, Staebler A (2017) CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule) Expression in Ovarian Carcinomas: Association With High-Grade and Advanced Stage But Not With Neuroendocrine Differentiation Int J Gynecol Cancer 27:239-245. doi: 10.1097/IGC.0000000000000888
55. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG (1997) Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor Immunity 6:199-208. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80426-4
56. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT (2002) Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy Immunol Rev 188:22-32. doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.18803.x
57. Epping MT, Hart AA, Glas AM, Krijgsman O, Bernards R (2008) PRAME expression and clinical outcome of breast cancer Br J Cancer 99:398-403. doi: 10.1038/sj.bjc.6604494
58. Li J, Yin J, Zhong J, Yang Z, Tang A, Li S (2020) Clinicopathological and Prognostic Significance of PRAME Overexpression in Human Cancer: A Meta-Analysis Biomed Res Int 2020:8828579. doi: 10.1155/2020/8828579

59. Blount SL, Liu X, McBride JD (2024) The Utilization of PRAME in the Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Melanoma Cells 13. doi: 10.3390/cells13201740
60. Al-Khadairi G, Decock J (2019) Cancer Testis Antigens and Immunotherapy: Where Do We Stand in the Targeting of PRAME? Cancers (Basel) 11. doi: 10.3390/cancers11070984
61. Naik A, Thomas R, Al-Khadairi G, Bacha R, Hendrickx W, Decock J (2021) Cancer testis antigen PRAME: An anti-cancer target with immunomodulatory potential J Cell Mol Med 25:10376-10388. doi: 10.1111/jcmm.16967
62. Weber JS, Vogelzang NJ, Ernstoff MS, Goodman OB, Cranmer LD, Marshall JL, Miles S, Rosario D, Diamond DC, Qiu Z, Obrocea M, Bot A (2011) A phase 1 study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors J Immunother 34:556-567. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182280db1
63. Lezcano C, Muller AM, Frosina D, Hernandez E, Geronimo JA, Busam KJ, Jungbluth AA (2021) Immunohistochemical Detection of Cancer-Testis Antigen PRAME Int J Surg Pathol 29:826-835. doi: 10.1177/10668969211012085
64. Kaczorowski M, Chlopek M, Kruczak A, Rys J, Lasota J, Miettinen M (2022) PRAME Expression in Cancer. A Systematic Immunohistochemical Study of >5800 Epithelial and Nonepithelial Tumors Am J Surg Pathol 46:1467-1476. doi: 10.1097/PAS.0000000000001944
65. Zhang W, Barger CJ, Eng KH, Klinkebiel D, Link PA, Omilian A, Bshara W, Odunsi K, Karpf AR (2016) PRAME expression and promoter hypomethylation in epithelial ovarian cancer Oncotarget 7:45352-45369. doi: 10.18632/oncotarget.9977
66. Odunsi K, Matsuzaki J, James SR, Mhawech-Fauceglia P, Tsuji T, Miller A, Zhang W, Akers SN, Griffiths EA, Miliotto A, Beck A, Batt CA, Ritter G, Lele S, Gnjatic S, Karpf AR (2014) Epigenetic potentiation of NY-ESO-1 vaccine therapy in human ovarian cancer Cancer Immunol Res 2:37-49. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0126
67. Pollack SM, Li Y, Blaisdell MJ, Farrar EA, Chou J, Hoch BL, Loggers ET, Rodler E, Eary JF, Conrad EU, 3rd, Jones RL, Yee C (2012) NYESO-1/LAGE-1s and PRAME are targets for antigen specific T cells in chondrosarcoma following treatment with 5-Aza-2-deoxycitabine PLoS One 7:e32165. doi: 10.1371/journal.pone.0032165
68. van Amerongen RA, Tuit S, Wouters AK, van de Meent M, Siekman SL, Meeuwsen MH, Wachsmann TLA, Remst DFG, Hagedoorn RS, van der Steen DM, de Ru AH, Verdegaal EME, van Veelen PA, Falkenburg JHF, Heemskerk MHM (2023) PRAME

and CTCFL-reactive TCRs for the treatment of ovarian cancer Front Immunol 14:1121973. doi: 10.3389/fimmu.2023.1121973

69. Fujiwara S (2023) Clinical perspectives of rare ovarian tumors: clear cell ovarian cancer Jpn J Clin Oncol 53:664-672. doi: 10.1093/jjco/hyad057

70. Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K (2000) Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy Cancer 88:2584-2589

71. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Ruschoff J, Kang YK, To GATI (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial Lancet 376:687-697. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X

72. Bartley AN, Washington MK, Colasacco C, Ventura CB, Ismaila N, Benson AB, 3rd, Carrato A, Gulley ML, Jain D, Kakar S, Mackay HJ, Streutker C, Tang L, Troxell M, Ajani JA (2017) HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology J Clin Oncol 35:446-464. doi: 10.1200/JCO.2016.69.4836

73. Fader AN, Roque DM, Siegel E, Buza N, Hui P, Abdelghany O, Chambers S, Secord AA, Havrilesky L, O'Malley DM, Backes FJ, Nevadunsky N, Edraki B, Pikaart D, Lowery W, ElSahwi K, Celano P, Bellone S, Azodi M, Litkouhi B, Ratner E, Silasi DA, Schwartz PE, Santin AD (2020) Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Compared with Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Advanced (Stage III-IV) or Recurrent Uterine Serous Carcinomas that Overexpress Her2/Neu (NCT01367002): Updated Overall Survival Analysis Clin Cancer Res 26:3928-3935. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0953

74. Koopman T, Louwen M, Hage M, Smits MM, Imholz AL (2015) Pathologic diagnostics of HER2 positivity in gastroesophageal adenocarcinoma Am J Clin Pathol 143:257-264. doi: 10.1309/AJCPCX69HGDDGYCQ

75. Koopman T, Smits MM, Louwen M, Hage M, Boot H, Imholz AL (2015) HER2 positivity in gastric and esophageal adenocarcinoma: clinicopathological analysis and

comparison J Cancer Res Clin Oncol 141:1343-1351. doi: 10.1007/s00432-014-1900-3

76. Zhu K, Yang X, Tai H, Zhong X, Luo T, Zheng H (2024) HER2-targeted therapies in cancer: a systematic review Biomark Res 12:16. doi: 10.1186/s40364-024-00565-1

77. Montemurro F, Delaloge S, Barrios CH, Wuerstlein R, Anton A, Brain E, Hatschek T, Kelly CM, Pena-Murillo C, Yilmaz M, Donica M, Ellis P (2020) Trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and brain metastases: exploratory final analysis of cohort 1 from KAMILLA, a single-arm phase IIIb clinical trial(☆) Ann Oncol 31:1350-1358. doi: 10.1016/j.annonc.2020.06.020

78. Shitara K, Bang YJ, Iwasa S, Sugimoto N, Ryu MH, Sakai D, Chung HC, Kawakami H, Yabusaki H, Lee J, Saito K, Kawaguchi Y, Kamio T, Kojima A, Sugihara M, Yamaguchi K, Investigators DE-G (2020) Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Gastric Cancer N Engl J Med 382:2419-2430. doi: 10.1056/NEJMoa2004413

79. Almstedt K, Heimes AS, Kappenberg F, Battista MJ, Lehr HA, Krajnak S, Lebrecht A, Gehrmann M, Stewen K, Brenner W, Weikel W, Rahnenfuhrer J, Hengstler JG, Hasenburg A, Schmidt M (2022) Long-term prognostic significance of HER2-low and HER2-zero in node-negative breast cancer Eur J Cancer 173:10-19. doi: 10.1016/j.ejca.2022.06.012

80. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, Ueno NT, Prat A, Chae YS, Lee KS, Niikura N, Park YH, Xu B, Wang X, Gil-Gil M, Li W, Pierga JY, Im SA, Moore HCF, Rugo HS, Yerushalmi R, Zagouri F, Gombos A, Kim SB, Liu Q, Luo T, Saura C, Schmid P, Sun T, Gambhire D, Yung L, Wang Y, Singh J, Vitazka P, Meinhardt G, Harbeck N, Cameron DA, Investigators DE-BT (2022) Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer N Engl J Med 387:9-20. doi: 10.1056/NEJMoa2203690

81. Modi S, Park H, Murthy RK, Iwata H, Tamura K, Tsurutani J, Moreno-Aspitia A, Doi T, Sagara Y, Redfern C, Krop IE, Lee C, Fujisaki Y, Sugihara M, Zhang L, Shahidi J, Takahashi S (2020) Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study J Clin Oncol 38:1887-1896. doi: 10.1200/JCO.19.02318

82. Modi S, Saura C, Yamashita T, Park YH, Kim SB, Tamura K, Andre F, Iwata H, Ito Y, Tsurutani J, Sohn J, Denduluri N, Perrin C, Aogi K, Tokunaga E, Im SA, Lee KS, Hurvitz SA, Cortes J, Lee C, Chen S, Zhang L, Shahidi J, Yver A, Krop I,

Investigators DE-B (2020) Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer N Engl J Med 382:610-621. doi: 10.1056/NEJMoa1914510

83. Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, Norgaard-Pedersen B, Hogdall CK (2003) Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study Cancer 98:66-73. doi: 10.1002/cncr.11476

84. Li BT, Smit EF, Goto Y, Nakagawa K, Udagawa H, Mazieres J, Nagasaka M, Bazhenova L, Saltos AN, Felip E, Pacheco JM, Perol M, Paz-Ares L, Saxena K, Shiga R, Cheng Y, Acharyya S, Vitazka P, Shahidi J, Planchard D, Janne PA, Investigators DE-LT (2022) Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer N Engl J Med 386:241-251. doi: 10.1056/NEJMoa2112431

85. Li M, Li H, Liu F, Bi R, Tu X, Chen L, Ye S, Cheng X (2017) Characterization of ovarian clear cell carcinoma using target drug-based molecular biomarkers: implications for personalized cancer therapy J Ovarian Res 10:9. doi: 10.1186/s13048-017-0304-9

86. Ross JS, Yang F, Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, Muraca PJ (1999) HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary Am J Clin Pathol 111:311-316. doi: 10.1093/ajcp/111.3.311

87. Tanabe H, Nishii H, Sakata A, Suzuki K, Mori Y, Shinozaki H, Watanabe A, Ochiai K, Yasuda M, Tanaka T (2004) Overexpression of HER-2/neu is not a risk factor in ovarian clear cell adenocarcinoma Gynecol Oncol 94:735-739. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.05.055

88. Wu Y, Soslow RA, Marshall DS, Leitao M, Chen B (2004) Her-2/neu expression and amplification in early stage ovarian surface epithelial neoplasms Gynecol Oncol 95:570-575. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.08.043

89. Kong BL, Stommel JM, Keck JM, Kilburn D, Streblow A, Egger J, Creason AL, Suciu CG, Guimaraes AR, Corless CL, Mills GB, Pejovic TB (2024) Exceptional Response to Trastuzumab Deruxtecan in a Patient With Recurrent Ovarian Clear Cell Carcinoma With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Expression JCO Precis Oncol 8:e2300686. doi: 10.1200/PO.23.00686

90. Meric-Bernstam F, Makker V, Oaknin A, Oh DY, Banerjee S, Gonzalez-Martin A, Jung KH, Lugowska I, Manso L, Manzano A, Melichar B, Siena S, Stroyakovskiy D, Fielding A, Ma Y, Puvvada S, Shire N, Lee JY (2024) Efficacy and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Expressing Solid Tumors: Primary

Results From the DESTINY-PanTumor02 Phase II Trial J Clin Oncol 42:47-58. doi: 10.1200/JCO.23.02005

91. Talia KL, Banet N, Buza N (2023) The role of HER2 as a therapeutic biomarker in gynaecological malignancy: potential for use beyond uterine serous carcinoma Pathology 55:8-18. doi: 10.1016/j.pathol.2022.11.004

92. Zhao D, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Sun J (2013) Prognostic role of hormone receptors in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis Int J Gynecol Cancer 23:25-33. doi: 10.1097/IGC.0b013e3182788466

93. Hoopmann M, Sachse K, Valter MM, Becker M, Neumann R, Ortmann M, Gohring UJ, Thomas A, Mallmann P, Schondorf T (2010) Serological and immunohistochemical HER-2/neu statuses do not correlate and lack prognostic value for ovarian cancer patients Eur J Cancer Care (Engl) 19:809-815. doi: 10.1111/j.1365-2354.2009.01112.x

94. Mateiou C, Lokhande L, Diep LH, Knulst M, Carlsson E, Ek S, Sundfeldt K, Gerdtsson A (2024) Spatial tumor immune microenvironment phenotypes in ovarian cancer NPJ Precis Oncol 8:148. doi: 10.1038/s41698-024-00640-8

95. Devlin MJ, Miller R, Laforets F, Kotantaki P, Garsed DW, Kristeleit R, Bowtell DD, McDermott J, Maniati E, Balkwill FR (2022) The Tumor Microenvironment of Clear-Cell Ovarian Cancer Cancer Immunol Res 10:1326-1339. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-22-0407

96. Sia TY, Manning-Geist B, Gordhandas S, Murali R, Marra A, Liu YL, Friedman CF, Hollmann TJ, Zivanovic O, Chi DS, Weigelt B, Konner JA, Zamarin D (2022) Treatment of ovarian clear cell carcinoma with immune checkpoint blockade: a case series Int J Gynecol Cancer 32:1017-1024. doi: 10.1136/ijgc-2022-003430

97. Arora S, Velichinskii R, Lesh RW, Ali U, Kubiak M, Bansal P, Borghaei H, Edelman MJ, Boumber Y (2019) Existing and Emerging Biomarkers for Immune Checkpoint Immunotherapy in Solid Tumors Adv Ther 36:2638-2678. doi: 10.1007/s12325-019-01051-z

98. Baretti M, Le DT (2018) DNA mismatch repair in cancer Pharmacol Ther 189:45-62. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.04.004

99. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, Miller R, Riaz N, Douillard JY, Andre F, Scarpa A (2019) ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1

expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach Ann Oncol 30:1232-1243. doi: 10.1093/annonc/mdz116

100. Ryan E, Sheahan K, Creavin B, Mohan HM, Winter DC (2017) The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing Crit Rev Oncol Hematol 116:38-57. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.05.006

101. Svrcek M, Lascols O, Cohen R, Collura A, Jonchere V, Flejou JF, Buhard O, Duval A (2019) MSI/MMR-deficient tumor diagnosis: Which standard for screening and for diagnosis? Diagnostic modalities for the colon and other sites: Differences between tumors Bull Cancer 106:119-128. doi: 10.1016/j.bulcan.2018.12.008

102. Buchanan DD, Tan YY, Walsh MD, Clendenning M, Metcalf AM, Ferguson K, Arnold ST, Thompson BA, Lose FA, Parsons MT, Walters RJ, Pearson SA, Cummings M, Oehler MK, Blomfield PB, Quinn MA, Kirk JA, Stewart CJ, Obermair A, Young JP, Webb PM, Spurdle AB (2014) Tumor mismatch repair immunohistochemistry and DNA MLH1 methylation testing of patients with endometrial cancer diagnosed at age younger than 60 years optimizes triage for population-level germline mismatch repair gene mutation testing J Clin Oncol 32:90-100. doi: 10.1200/JCO.2013.51.2129

103. Kloor M, Huth C, Voigt AY, Benner A, Schirmacher P, von Knebel Doeberitz M, Blaker H (2012) Prevalence of mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome: a pathological study Lancet Oncol 13:598-606. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70109-2

104. Bennett JA, Pesci A, Morales-Oyarvide V, Da Silva A, Nardi V, Oliva E (2019) Incidence of Mismatch Repair Protein Deficiency and Associated Clinicopathologic Features in a Cohort of 104 Ovarian Endometrioid Carcinomas Am J Surg Pathol 43:235-243. doi: 10.1097/PAS.0000000000001165

105. Leskela S, Romero I, Cristobal E, Perez-Mies B, Rosa-Rosa JM, Gutierrez-Pecharroman A, Caniego-Casas T, Santon A, Ojeda B, Lopez-Reig R, Palacios-Berraquero ML, Garcia A, Ibarra J, Hakim S, Guarch R, Lopez-Guerrero JA, Poveda A, Palacios J (2020) Mismatch Repair Deficiency in Ovarian Carcinoma: Frequency, Causes, and Consequences Am J Surg Pathol 44:649-656. doi: 10.1097/PAS.0000000000001432

106. Nonomura Y, Nakayama K, Nakamura K, Razia S, Yamashita H, Ishibashi T, Ishikawa M, Sato S, Nakayama S, Otsuki Y, Kyo S (2022) Ovarian Endometrioid and Clear Cell Carcinomas with Low Prevalence of Microsatellite Instability: A Unique Subset of Ovarian Carcinomas Could Benefit from Combination Therapy with Immune

Checkpoint Inhibitors and Other Anticancer Agents Healthcare (Basel) 10. doi: 10.3390/healthcare10040694

107. Oliveira D, Schnack TH, Poulsen TS, Christiansen AP, Hogdall CK, Hogdall EV (2021) Genomic Sub-Classification of Ovarian Clear Cell Carcinoma Revealed by Distinct Mutational Signatures Cancers (Basel) 13. doi: 10.3390/cancers13205242

108. Rambau PF, Duggan MA, Ghatage P, Warfa K, Steed H, Perrier R, Kelemen LE, Kobel M (2016) Significant frequency of MSH2/MSH6 abnormality in ovarian endometrioid carcinoma supports histotype-specific Lynch syndrome screening in ovarian carcinomas Histopathology 69:288-297. doi: 10.1111/his.12934

109. Segev Y, Pal T, Rosen B, McLaughlin JR, Sellers TA, Risch HA, Zhang S, Sun P, Narod SA, Schildkraut J (2014) Risk factors for ovarian cancers with and without microsatellite instability Int J Gynecol Cancer 24:664-669. doi: 10.1097/IGC.0000000000000134

110. Simila-Maarala J, Soovares P, Pasanen A, Ahvenainen T, Vahteristo P, Butzow R, Lassus H (2022) TCGA molecular classification in endometriosis-associated ovarian carcinomas: Novel data on clear cell carcinoma Gynecol Oncol 165:577-584. doi: 10.1016/j.ygyno.2022.03.016

111. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, Middha S, Hechtman J, Zehir A, Dubard-Gault M, Tran C, Stewart C, Sheehan M, Penson A, DeLair D, Yaeger R, Vijai J, Mukherjee S, Galle J, Dickson MA, Janjigian Y, O'Reilly EM, Segal N, Saltz LB, Reidy-Lagunes D, Varghese AM, Bajorin D, Carlo MI, Cadoo K, Walsh MF, Weiser M, Aguilar JG, Klimstra DS, Diaz LA, Jr., Baselga J, Zhang L, Ladanyi M, Hyman DM, Solit DB, Robson ME, Taylor BS, Offit K, Berger MF, Stadler ZK (2019) Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer J Clin Oncol 37:286-295. doi: 10.1200/JCO.18.00283

112. Bolton KL, Chen D, Corona de la Fuente R, Fu Z, Murali R, Kobel M, Tazi Y, Cunningham JM, Chan ICC, Wiley BJ, Moukarzel LA, Winham SJ, Armasu SM, Lester J, Elishaev E, Laslavic A, Kennedy CJ, Piskorz A, Sekowska M, Brand AH, Chiew YE, Pharoah P, Elias KM, Drapkin R, Churchman M, Gourley C, DeFazio A, Karlan B, Brenton JD, Weigelt B, Anglesio MS, Huntsman D, Gayther S, Konner J, Modugno F, Lawrenson K, Goode EL, Papaemmanuil E (2022) Molecular Subclasses of Clear Cell Ovarian Carcinoma and Their Impact on Disease Behavior and Outcomes Clin Cancer Res 28:4947-4956. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-3817

113. Adamson AW, Ding YC, Steele L, Leong LA, Morgan R, Wakabayashi MT, Han ES, Dellinger TH, Lin PS, Hakim AA, Wilczynski S, Warden CD, Tao S, Bedell V, Cristea MC, Neuhausen SL (2023) Genomic analyses of germline and somatic variation in high-grade serous ovarian cancer J Ovarian Res 16:141. doi: 10.1186/s13048-023-01234-x

114. Holy P, Hlavac V, Seborova K, Susova S, Tesarova T, Rob L, Hruda M, Bouda J, Bartakova A, Mrhalova M, Kopeckova K, Al Obeed Allah M, Spacek J, Sedlakova I, Soucek P, Vaclavikova R (2024) Targeted DNA sequencing of high-grade serous ovarian carcinoma reveals association of TP53 mutations with platinum resistance when combined with gene expression Int J Cancer 155:104-116. doi: 10.1002/ijc.34908

115. Montemorano L, Shultz ZB, Farooque A, Hyun M, Chappell RJ, Hartenbach EM, Lang JD (2024) TP53 mutations and the association with platinum resistance in high grade serous ovarian carcinoma Gynecol Oncol 186:26-34. doi: 10.1016/j.ygyno.2024.03.023

116. Fukumoto T, Park PH, Wu S, Fatkhutdinov N, Karakashev S, Nacarelli T, Kossenkov AV, Speicher DW, Jean S, Zhang L, Wang TL, Shih IM, Conejo-Garcia JR, Bitler BG, Zhang R (2018) Repurposing Pan-HDAC Inhibitors for ARID1A-Mutated Ovarian Cancer Cell Rep 22:3393-3400. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.019

117. Shen J, Peng Y, Wei L, Zhang W, Yang L, Lan L, Kapoor P, Ju Z, Mo Q, Shih Ie M, Uray IP, Wu X, Brown PH, Shen X, Mills GB, Peng G (2015) ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors Cancer Discov 5:752-767. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0849