

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Antropologie a genetika člověka



Bc. Laura Matoušková

**Molekulární aberace u testikulárních germinálních nádorů a jejich význam v nádorové
patogenezi a klinické praxi**

Molecular aberrations in testicular germ cell tumors and their significance in tumor
pathogenesis and clinical practice

Diplomová práce

Vedoucí práce: MUDr. Ludmila Boublíková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 8. 2022

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své vedoucí, MUDr. Ludmile Boublíkové, Ph.D., za odborné rady, trpělivost a ochotu po celou dobu psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Zwyrtkové za praktické zaučení a podporu během mnoha měsíců strávených v laboratoři. V neposlední řadě děkuji i ostatním pracovníkům skupiny CLIP na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za jejich pomoc a rady.

Abstrakt

Testikulární germinální nádory (TGCT) jsou celkově vzácné, ale současně také nejčastěji se vyskytující zhoubné nádory u dospívajících a mladých mužů. Predispozice pro vznik TGCT zahrnují faktory genetické – několik desítek objevených rizikových lokusů v DNA, epigenetické změny DNA, alterace různých signálních drah, i zevní rizikové faktory environmentálního charakteru. Tyto nádory často velmi dobře reagují na léčbu cisplatinou, nicméně u části pacientů dochází k rezistenci na toto cytostatikum. Vznik cisplatinové rezistence, stejně tak jako molekulárně-biologické vlastnosti TGCT a jejich role v patogenezi, jsou doposud relativně málo probádané jevy. S tím souvisí i malý pokrok v léčbě TGCT a nedostupnost cílené biologické léčby, která by byla efektivní u pacientů s cisplatinovou rezistencí a/nebo celkově špatnou prognózou onemocnění. Vzhledem k tomu, že incidence TGCT v posledních desetiletích stoupá, jedná se o aktuální problém vyžadující urgentní řešení, jehož cílem je zlepšení přežití i kvality života pacientů s pokročilým TGCT.

V teoretické části se práce věnuje hlavním v současnosti známým molekulárním charakteristikám TGCT a cisplatinové rezistence, mechanismům jejich vzniku, vlivu vnějších faktorů a mezipopulačním rozdílům ve výskytu TGCT. Cílem praktické části práce je identifikace a interpretace molekulárních aberací ve vzorcích pacientů s rezistentními TGCT z Onkologické kliniky 1. lékařské fakulty a Fakultní Thomayerovy nemocnice, zařazených do probíhající výzkumné studie, a to primárních nádorů, metastáz a volné cirkulující DNA (cfDNA), které byly vyšetřovány metodou celoexomového sekvenování. Smyslem práce je nálezt ty molekulární aberace, které mohou souviset s vývojem onemocnění nebo vznikem rezistence na cisplatinu a které by mohly být využity pro nové léčebné postupy a cílenou biologickou léčbu.

Klíčová slova

testikulární germinální nádory, molekulární aberace, cisplatinová rezistence, celoexomové sekvenování

Abstract

Testicular germ cell tumors (TGCT) are rare in general but they are also the most commonly occurring malignant tumors in adolescent and young males. Predispositions for the incidence of TGCT include genetic factors – a number of discovered DNA risk loci, epigenetic changes in DNA, alterations of various signaling pathways and also external environmental risk factors. These tumors usually respond to cisplatin therapy very well, nevertheless some patients develop a resistance to this cytostatic medicament. There is still relatively small amount of research dedicated to the cause of cisplatin resistance, as well as to bio-molecular characteristics of TGCT and their role in the pathogenesis. As a result, there is only a little development in TGCT therapy to this day and thus there is no targeted therapy available, which would be highly effective for treating patients with developed cisplatin resistance and/or poor prognosis of their disease. As a result of the fact that TGCT incidence is increasing in the recent decades, it can be considered an actual problem requiring urgent addressing in order to improve the survival rate and quality of life of patients with advanced TGCT.

Theoretical part of this thesis deals with the main currently known molecular characteristics of TGCT as well as cisplatin resistance, mechanisms of their origin, and lastly the influence of external risk factors and interpopulation variability of TGCT incidence. The aim of the practical part is to identify and interpret molecular aberrations in TGCT samples of patients resistant to cisplatin from Department of Oncology of 1st Faculty of Medicine and Thomayer University Hospital. These patients are included in an ongoing research study and the gathered material consists of primary tumor samples, metastasis and cell free DNA (cfDNA) samples which were analyzed by whole-exome sequencing. The main goal of this thesis is to find those molecular aberrations that could be associated with development of the disease and with cisplatin resistance and therefore could be used as a basis for new therapy methods and targeted biological therapy.

Keywords

testicular germ cell tumors, molecular aberrations, cisplatin resistance, whole exome sequencing

Seznam zkratek

A	adenin
ANKRD30A	gen ANKRD30A (z angl. <i>Ankyrin Repeat Domain 30A</i>)
ATP	adenosintrifosfát (z angl. <i>Adenosine Triphosphate</i>)
BRAF	gen BRAF (z angl. <i>B-Raf proto-oncogene</i>)
C	cytosin
CCND2	gen CCND2 (z angl. <i>Cyclin D2</i>)
CDC27	gen CDC27 (z angl. <i>Cell Division Cycle 27</i>)
cfDNA	volná cirkulující DNA (z angl. <i>cell free DNA</i>)
CFLAR	gen CFLAR (z angl. <i>CASP8 and FADD like apoptosis regulator</i>)
dAMP	deoxyadenosin 5' monofosfát (z angl. <i>Deoxyadenosine 5'-Monophosphate</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNAH12	gen DNAH12 (z angl. <i>Dynein Axonemal Heavy chain 12</i>)
dNTP	deoxynukleotid trifosfát (z angl. <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>)
EAU	Evropská asociace urologie (z angl. <i>European Association of Urology</i>)
F1	první filiální generace
F3	třetí filiální generace
FFPE	formaldehyd pevné parafín vložené (z angl. <i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>)
G	guanin
GCNIS	testikulární germinální neoplázie <i>in situ</i> (z angl. <i>testicular Germ Cell Neoplasia In Situ</i>)
gDNA	genomická/germ-line DNA (z angl. <i>genomic/germ-line DNA</i>)
GTP	guanosintrifosfát (z angl. <i>Guanosine Triphosphate</i>)
HGC6.3	gen HGC6.3 (z angl. <i>uncharacterized LOC100128124</i>)
HIC1	gen HIC1 (z angl. <i>HIC ZBTB transcriptional repressor 1</i>)
ICM	embryoblast (z angl. <i>Inner Cell Mass</i>)
KIT	gen KIT (z angl. <i>KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase</i>)
KLF11	gen KLF11 (z angl. <i>KLF transcription factor 11</i>)
KRAS	gen KRAS (za angl. <i>Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i>)
LIN28	gen LIN28

Mb	megabáze
MDM2	gen MDM2 (z angl. <i>Mouse double minute 2 homolog</i>)
MGMT	gen MGMT (z angl. <i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>)
miRNA	micro ribonukleotidová kyselina (z angl. <i>micro Ribonucleic Acid</i>)
mRNA	messenger RNA (z angl. <i>messenger RNA</i>)
NANOG	gen NANOG (z angl. <i>Nanog homeobox</i>)
NaOH	hydroxid sodný
nM	nanomolární
NRAS	gen NRAS (z angl. <i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>)
OCT3/4	gen OCT3/4 (z angl. <i>Octamer-binding Transcription factor 3/4</i>)
PGC	primordiální germinální buňka (z angl. <i>Primordial Germ Cell</i>)
pM	pikomolární
POU5F1	gen POU5F1 (z angl. <i>POU domain, class 5, transcription Factor 1</i>)
PRAMEF8	gen PRAMEF8 (z angl. <i>PRAME family member 8</i>)
PRDM9	gen PRDM9 (z angl. <i>PR/SET domain 9</i>)
RARB	gen RARB (z angl. <i>Retinoic Acid Receptor Beta</i>)
RAS	rodina genů RAS (z angl. <i>Retrovirus-Associated DNA Sequences</i>)
RASSF1A	gen RASSF1A (z angl. <i>Ras association domain family member 1</i>)
RBMX	gen RBMX (z angl. <i>RNA binding motif protein X-linked</i>)
RBMX	gen RBMY (z angl. <i>RNA binding motif protein, Y chromosome</i>)
REV7	gen REV7 (z angl. <i>DNA polymerase zeta processivity subunit-like</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	otáčky za minutu (z angl. <i>revolutions per minute</i>)
SOX2	gen SOX2 (z angl. <i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>)
T	thymin
TGCT	testikulární germinální nádory (z angl. <i>Testicular Germinal Cell Tumors</i>)
TP53	gen TP53 (z angl. <i>Tumor Protein P53</i>)
TPTE2	gen TPTE2 (z angl. <i>Transmembrane Phosphoinositide 3-phosphatase and Tensin homolog 2</i>)
trisHCl	Hydrochlorid 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (z angl. <i>tris Hydrochloride</i>)

TSPAN16	gen TSPAN16 (z angl. <i>Tetraspanin 16</i>)
UNG	uracil-DNA glykosyláza (za angl. <i>Uracil-DNA Glycosylase</i>)
VNTR	tandemové repetice VNTR (z angl. <i>Variable Number Tandem Repeat</i>)
XIST	gen XIST (z angl. <i>X Inactive Specific Transcript</i>)
YST	nádor žloutkového váčku (z angl. <i>Yolk Sac Tumor</i>)

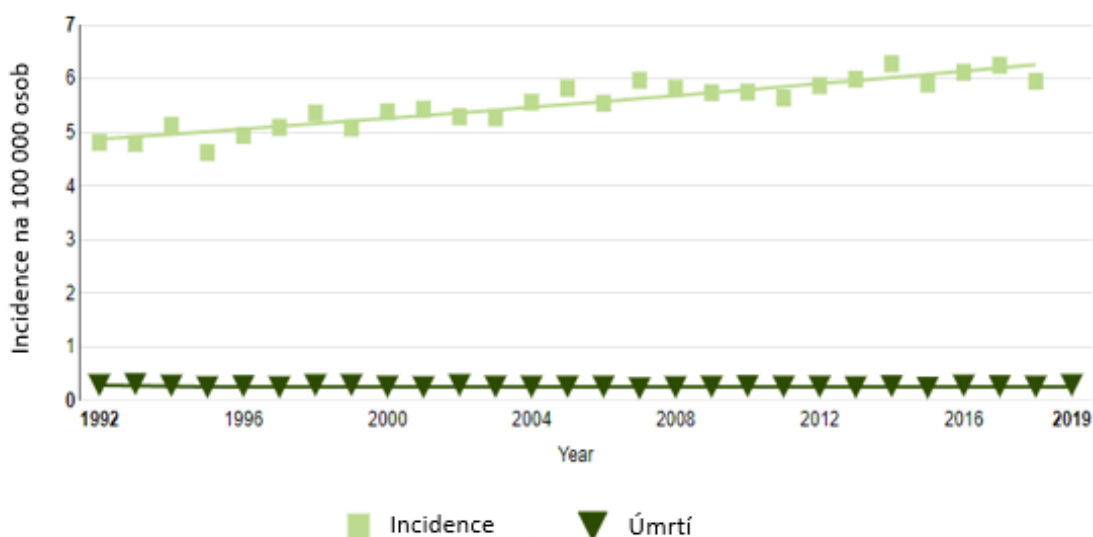
Obsah

1. Úvod.....	8
1.1. Molekulární charakteristika TGCT	9
1.1.1. Chromozomální aberace.....	10
1.1.2. Genové mutace.....	11
1.1.3. Epigenetické změny	13
1.2. Vznik cisplatinové rezistence	15
1.2.1. Kandidátní geny a regulátory pluripotence	15
1.2.2. Metylace DNA	16
1.3. Negenetické faktory.....	18
1.3.1. Prenatální a perinatální rizikové faktory	18
1.3.2. Postnatální rizikové faktory	19
1.4. Výskyt TGCT napříč populacemi.....	21
2. Cíl práce	24
3. Materiál a metody	25
3.1. Izolace DNA.....	26
3.1.1. Izolace cfDNA.....	26
3.1.2. Izolace DNA z FFPE vzorků.....	27
3.1.3. Izolace gDNA.....	28
3.2. Fragmentace DNA	28
3.3. Příprava knihoven.....	28
3.4. Úprava knihoven k sekvenování nové generace.....	30
3.5. Hodnocení kvality DNA.....	31
3.5.1. Spektrofotometrické hodnocení kvality DNA.....	31
3.5.2. Elektroforetické hodnocení kvality DNA	31
3.6. Celoexomové sekvenování	32
4. Výsledky	34
4.1. Analýza počtu mutací v jednotlivých typech vzorků	34
4.2. Analýza jednotlivých genů	36
4.2.1. RBMX.....	37
4.2.2. TPTE2	38
4.2.3. PRAMEF8.....	38

4.2.4.	TSPAN16	39
4.2.5.	CDC27.....	39
4.2.6.	PRDM9.....	40
4.2.7.	DNAH12	40
4.2.8.	ANKRD30A.....	41
4.2.9.	HGC6.3	41
5.	Diskuze	43
6.	Závěr	46
7.	Seznam literatury	47

1. Úvod

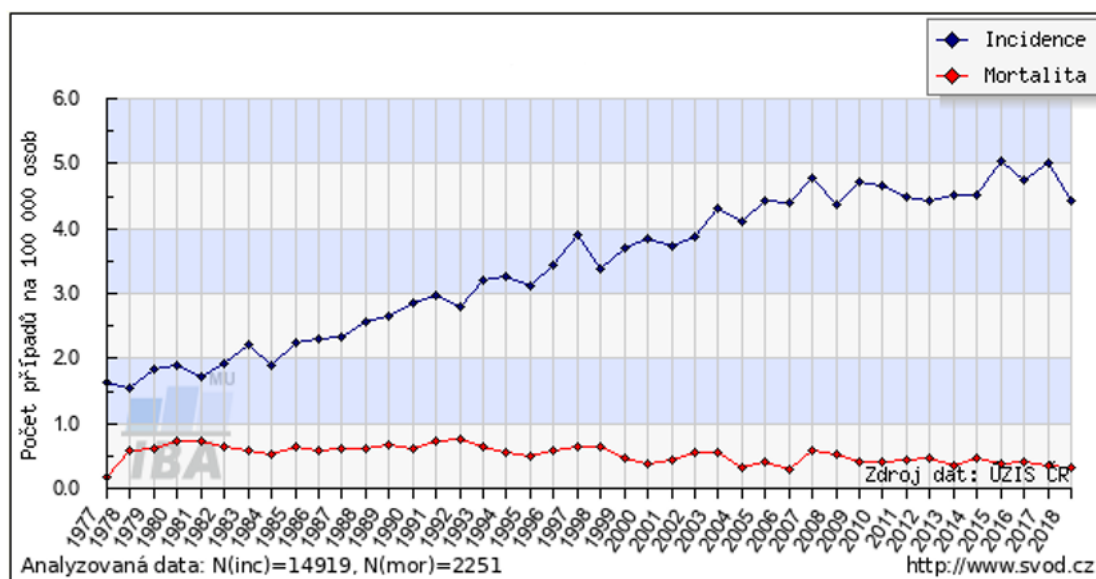
Testikulární germinální nádory (TGCT) jsou nejčastější solidní nádory (tj. ty, které vytvářejí ohraničená ložiska nádorových buněk), jež jsou diagnostikovány u mladých mužů ve věku 18-35 let a jejich incidence stále stoupá (Znaor et al., 2020) jak v České republice, tak celosvětově (viz Grafy 1 a 2). Patří mezi nádory vysoce chemosenzitivní, tzn. velmi dobře reagující na léčbu chemoterapií. V případě TGCT se využívá v chemoterapii cisplatina. Cisplatina je alkylační cytostatikum obsahující platinu a dva chloridové ionty v poloze cis. Váže se na DNA buněk, narušuje její funkce a vyvolává apoptózu zejména u rychle se dělících buněk. Vysoká chemosenzitivita nicméně neznamená, že by TGCT byly zcela vyléčitelné – dle Evropské asociace urologie (EAU) dojde k relapsu po první linii léčby přibližně u 15-30 % pacientů (Albers et al., 2011). I tak se díky léčbě cisplatinou zvýšilo 5leté přežití pacientů z 63 % na více než 90 % (Bray et al., 2006).



Graf 1: Vývoj celosvětové incidence TGCT a úmrtí na onemocnění od roku 1992 do roku 2019. (upraveno podle <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/testis.html> - National Cancer Institute)

TGCT můžeme rozdělit dle epidemiologických, klinických a histologických kritérií do tří podskupin (Reuter, 2005), viz Schéma 1 v podkapitole níže. Do první skupiny patří teratomy (nádory složené z různých tkání embryonálního původu) a nádory žloutkového váčku u novorozenců a dětských pacientů. Druhá skupina zahrnuje germinální nádory – seminomy a neseminomy postpubertálních pacientů. Výskyt seminomů a neseminomů je podobný – seminomy tvoří přibližně 55 % diagnostikovaných neoplázií (Trabert et al., 2015). Třetí skupinu představují spermatocytární seminomy, které postihují pacienty starší 40 let. Druhá

skupina je zdaleka nejpočetnější skupinou germinálních nádorů – představuje okolo 98 % všech TGCT neoplázií. Proto se v následujících podkapitolách bude tato práce věnovat problematice především této skupiny testikulárních germinálních nádorů.



Graf 2: Vývoj incidence TGCT a úmrtí na onemocnění v České republice od roku 1977 do roku 2018 (převzato z www.svod.cz)

1.1. Molekulární charakteristika TGCT

Vznik TGCT podmiňuje řada genetických a environmentálních faktorů. Změny, které jsou těmito faktory zapříčiněny, probíhají jak během prenatálního vývoje, tak i po narození (viz Schéma 1). Maligní transformace testikulárních germinálních buněk začíná již během vývoje *in utero*, kdy dochází k zastavení vývoje germinálních buněk ve stádiu gonocytů (Skakkebaek et al., 1987). V tomto stádiu jsou germinální buňky demetylovány, a tudíž jsou náchylné k mutacím, ke kterým dochází během následného dělení buněk. Vlivem mnoha faktorů, které budou popsány v následujících podkapitolách, dochází k transformaci těchto gonocytů do testikulární germinální neoplázie *in situ* (GCNIS). Tato neoplázie je prekurzorem ke vzniku TGCT – k její maligní transformaci dochází během puberty/rané dospělosti vlivem hormonálních změn. Vzhledem k embryonálnímu původu TGCT je v porovnání s ostatními solidními nádory v jejich nádorových buňkách relativně malá frekvence výskytu mutací, a to 0,5 mutací na Mb (Litchfield et al., 2015). Níže je uveden výčet doposud nejznámějších molekulárních aberací vyskytující se v nádorových buňkách TGCT.

1.1.1. Chromozomální aberace

Nejtypičtější znak vyskytující se téměř ve všech nádorových buňkách TGCT, je amplifikace krátkého raménka 12. chromozomu (12p). Nejčastější formou je tvorba izochromozomu i(12p) – tato aberace byla také popsána jako první ze všech v roce 1982 (Atkin & Baker, 1982). Méně často dochází k duplikaci 12p, nebo k amplifikacím kratších úseků DNA na tomto raménku. Vzhledem k tomu, že izochromozom i(12p) není oproti buňkám TGCT pozorován v neinvazivních neopláziích (Ottesen et al., 2003) se předpokládá, že vznik i(12p) je přímo spojen s transformací do invazivní formy. Z toho vyplývá, že geny vyskytující se na raménku 12p hrají zásadní roli ve vzniku TGCT, resp. jejich amplifikovaná forma a následná nadprodukce proteinů, jež kódují. Přesný mechanismus toho, jak izochromozom i(12p) ovlivňuje vznik TGCT prozatím není znám, nicméně byly objeveny kandidátní geny, u kterých se předpokládá, že se na tomto procesu podílí. Mezi tyto geny patří např. gen *CCND2* (Skotheim et al., 2003), gen pro cyklin D2. Cyklin D2 je jeden z proteinů, který kontroluje buněčné dělení – konkrétně přechod z G1 do S fáze, kdy dochází k replikaci DNA. Dalšími z kandidátních genů jsou onkogen *KRAS* a transkripční faktor *OCT3/4* (Loveland et al., 2007) (v literatuře uváděn také jako *POU5F1*). *OCT3/4* spolu s genem *SOX2* tvoří regulační komplex, jenž ovlivňuje expresi genů, které hrají důležitou roli v sebeobnově a udržování pluripotence (schopnosti se diferencovat do různých buněčných typů) embryonálních kmenových buněk. Expresi výše zmíněných transkripčních faktorů *OCT3/4* a *SOX2* ovlivňuje gen *NANOG*, který se podílí na udržování embryonálního charakteru buněk. V procesu spermatogeneze dochází k postupnému snižování jeho exprese v rámci diferenciaci buněk (Nettersheim et al., 2011). V patologickém procesu spermatogeneze při vzniku TGCT, kdy dojde k zastavení diferenciaci buněk ve stádiu gonocytů (viz Schéma 1), se gen *NANOG* nachází v hypometylovaném stavu a dochází k jeho vysoké expresi. S funkcí tohoto genu souvisí i hypersenzitivní odpověď buněk na poškození DNA – uvažuje se tedy, že právě vysoká exprese tohoto genu by mohla být podkladem pro vysokou chemosenzitivitu buněk TGCT na chemoterapii obsahující cisplatinu, která strukturu DNA narušuje.

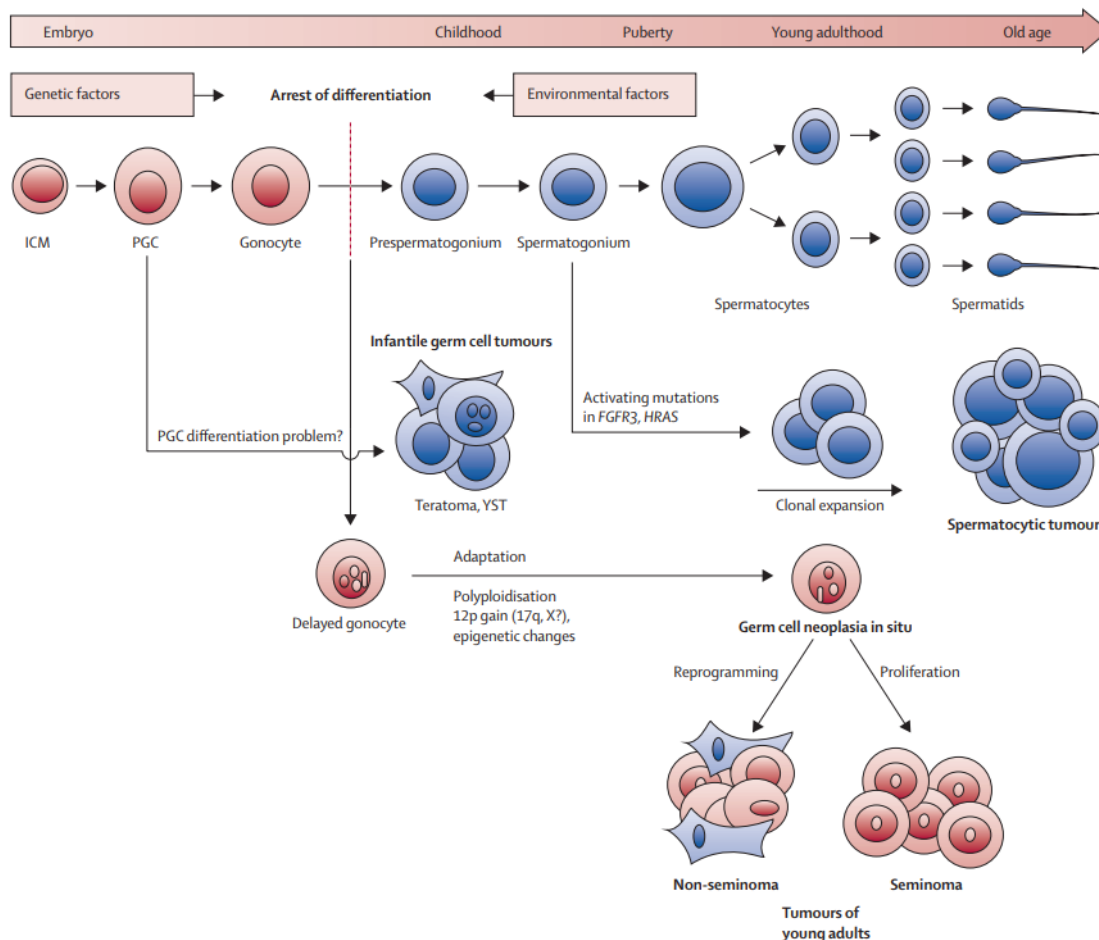


Schéma 1: Mechanismus vzniku tří podskupin TGCT. Na horní ose jsou zobrazena stádia lidského života, níže schéma spermatogeneze, její patologické odchylky a vybrané genetické změny, které vedou ke vzniku všech podskupin TGCT. ICM = embryoblast; PGC = primordiální germinální buňky; YST = nádor žloutkového vaku. (Rajpert-De Meyts et al., 2016)

Mimo typické aberace raménka 12p byly vypořizovány i méně časté chromozomální aberace vyskytující se v buňkách TGCT. V komparativní studii Kraggerud et al., 2002 autoři našli v nádorových buňkách aberace u chromozomů 4, 7, 8, 11, 13, 18 a X ve více než 50 % případů. Ve 33 zkoumaných vzorcích porovnávali mezi sebou také aberace u seminomů a neseminomů. Zjistili, že u seminomů se nacházely významně častěji amplifikace dlouhých ramének 15. a 22. chromozomu a u neseminomů se jednalo o amplifikace dlouhého raménka 17. a delece dlouhého raménka 10. chromozomu.

1.1.2. Genové mutace

Jak bylo již zmíněno výše, pro TGCT je mj. typická nízká frekvence mutací. Zde budou popsány vybrané geny, které byly nalezeny v nádorových buňkách TGCT ve větší míře a mohou pomoci objasnit dosud ne zcela známý vývoj TGCT.

Mezi nejčastěji mutované geny patří gen *KIT*, protoonkogen kódující tyrosinkinázový receptor, jehož fosforylace aktivuje signální kaskádu, která ovlivňuje proliferaci a migraci germinálních buněk (Vliagoftis et al., 1997). Výskyt této mutace v některých studiích dosahuje až 25 % a je typický především pro seminomy (Kemmer et al., 2004). Existují studie, které poukazují na velké rozdíly v četnosti mutovaného genu *KIT* u pacientů s bilaterálním TGCT oproti těm s unilaterálním. Např. Biermann et al., 2007 našli tuto mutaci u 63,6 % bilaterálních vzorků a pouze u 6,4 % unilaterálních. Tento objev poukazuje na možný vznik této mutace velmi brzy v embryonálním vývoji, a to před tím, než primordiální embryonální buňky vycestují do genitálních lišt. Ve studii Looijenga et al., 2003 byl poměr této mutace dokonce 93 % v bilaterálních vzorcích k 1,3 % v unilaterálních. Z toho by se dalo vyvozovat, že tato mutace je spojena se vznikem bilaterálního TGCT a pokud by byla nalezena tato mutace u pacientů s dosud unilaterální formou, mohla by být zahájena specializovaná léčba, která by zabránila rozvoji bilaterálního TGCT. Je ale otázkou, nakolik je tato teorie pravdivá, jelikož jiné studie, které se zabývaly touto problematikou (např. Coffey et al., 2008), rozdíly v této mutaci mezi unilaterálními a bilaterálními vzorky TGCT nezaznamenaly, resp. velmi malé.

Dalšími mutovanými geny popsanými v nádorových buňkách TGCT jsou geny z rodiny protoonkogenů *RAS* – *KRAS* a *NRAS* (Loveland et al., 2007b). Tyto geny kódují proteiny zapojené do RAS/MAPK signální dráhy. Jsou to proteiny s GTPázovou aktivitou, které přenášejí signály z vnějšku do buněčného jádra – na základě těchto signálů buňky proliferují a diferencují se a v případě potřeby dochází k navození apoptózy (programované buněčné smrti). V případě mutací těchto genů může dojít k nádorové transformaci buněk. Zajímavé je, že Honecker et al., 2009 vyzorovali, že mutace v genu *KRAS* se téměř nevyskytovala ve vzorcích, které byly chemorezistentní vůči cisplatině.

Mutace v tumor supresorovém genu *TP53* jsou u TGCT velmi vzácné, přestože právě tento gen patří mezi nejčastěji mutované v solidních nádorech. Uvádí se i méně než ve 3 % případů, v případě chemorezistentních vzorků jsou mutace o něco častější (Lutzker, 1998). Často diskutovaným genem, hlavně co se týče jeho roli při vzniku chemorezistence na cisplatinu, je i gen *BRAF*, kterému bude dále věnován prostor v následující podkapitole. Jedním z méně publikovaných poznatků je objev mutace v dalším tumor supresorovém genu *CDC27*. Litchfield et al., 2015 vyzorovali její 11,9% výskyt ve zkoumaných 42 vzorcích.

S přibývajícemi studiemi, které se věnují celoexomovému sekvenování vzorků TGCT, dochází v posledních letech k objevům stále více mutovaných genů v nádorových buňkách a také ve volné cirkulující DNA (cfDNA). Jejich vliv na vývoj nádoru, prognózu pacientů a potažmo cílenou léčbu je v současné době stále předmětem výzkumu.

1.1.3. Epigenetické změny

Ukazuje se, že i epigenetické modifikace by mohly nejspíše být přínosným biomarkerem pro diagnostiku a prognózu TGCT. Objev epigenetických vzorců v buňkách TGCT by mohl pomoci objasnit dosud neznámé mechanismy ve vývoji TGCT a prostřednictvím těchto informací i zlepšit terapeutické postupy. Tento text se bude věnovat objevům v oblastech metylace DNA, histonových modifikací a krátkých nekódujících RNA.

Metylace DNA ovlivňuje expresi genů a podílí se na stabilitě heterochromatinu v centromerických a telomerických oblastech tím, že znemožňuje rekombinaci v těchto částech chromozomů během dělení buněk (Xu et al., 1999). V případě poškození normálního metylačního vzorce dochází k poruchám genomové stability, která se může přímo podílet na vzniku rakoviny (Gopalakrishnan et al., 2008). Obecně můžeme říci, že celková úroveň metylace v nádorových buňkách je nižší, než u zdravých buněk, tj. DNA je hypometylována. U TGCT byl vyzorován rozdíl celkové úrovně metylace (metylomu) při porovnání seminomů a neseminomů – seminomy společně s neopláziemi GCNIS vykazují významnou hypometylací v porovnání s neseminomy (Netto et al., 2008). Tento fakt by mohl pomoci k rozeznání těchto druhů TGCT v diagnostice. Ukazuje se, že rozdíly v metylaci jednotlivých genů, resp. jejich promotorech, by mohly sloužit jako biomarker pro samotnou diagnostiku TGCT. Ve studii Kawakami et al., 2004 zkoumali metylaci genu *XIST* v buňkách TGCT a zjistili, že v 93 % vzorků nádorové tkáně a v 64 % vzorků plazmy se vyskytuje v nemetylovaném stavu. Gen *XIST* se podílí na inaktivaci chromozomu X v lidských buňkách a je exprimován pouze tehdy, když se v buňce vyskytuje chromozom X dvakrát. Z toho vyplývá, že muži s genotypem XY mají tento gen neaktivní – metylován – a proto by mohla být přítomnost nemetylované varianty tohoto genu dobrým ukazatelem výskytu TGCT.

Obdobně jako metylace DNA, i metylace histonů (nukleoproteinů) ovlivňuje transkripci genů. Lambrot & Kimmins, 2011 poukazují na spojitost aberantní metylace histonů H3K4 a H3K9 s abnormální expresí transkripčního faktoru *OCT3/4* a tumor supresorového genu *RASSF1A* v buňkách TGCT. Celkově jsou doposud histonové modifikace ve spojitosti s TGCT relativně málo prozkoumány a jejich diagnostický nebo prognostický význam je zatím nejasný.

Oproti tomu krátké nekódující RNA jsou předmětem intenzivního zkoumání, protože přítomnost určitých konkrétních miRNA (microRNA) v krevní plasmě se jeví jako biomarker TGCT s výrazně vyšší senzitivitou a specificitou než ty v současnosti používané. MiRNA jsou malé jednořetězcové molekuly RNA o délce 21-23 nukleotidů, které se podílejí na regulaci genové exprese a poruchy v jejich funkci mohou být ukazatelem mnoha chorob.

Syrin et al., 2015 vypořozovali zvyřenou hladinu nřkolika miRNA ve vzorcich TGCT, přicemř jedna z nich – miR-371a-3p – dokázala v 84,7 % pozitivně identifikovat onemocnění. O dva roky později Dieckmann et al., 2017 v obdobné studii potvrdili velmi dobrou senzitivitu miR-371a-3p, a to na 88,7 %, což pravděpodobně dělá z této miRNA dosud nejlepší diagnostický biomarker TGCT, oproti dnes používaným (např. choriový gonadotropin hCG nebo alfa-1fetoprotein AFP) se senzitivitou zpravidla menři než 60 %.

1.2. Vznik cisplatinové rezistence

Jak již bylo zmíněno výše, testikulární germinální nádory vykazují vysokou senzitivitu k chemoterapeutické léčbě cisplatinou. Mechanismus této velmi silné chemosenzitivity, stejně tak jako vznik rezistence na toto cytostatikum, ještě není zcela znám. V současné době se uvažuje především o následujících faktorech.

1.2.1. Kandidátní geny a regulátory pluripotence

Jeden z nich představuje tumor supresorový gen *TP53* a jeho neobvykle malá míra mutace v nádorových buňkách TGCT. Za normálních okolností dochází při poškození DNA k aktivaci signalizační kaskády, při níž dojde k uvolnění produktu genu *TP53* – proteinu p53. Aktivní forma tohoto proteinu indukuje tvorbu proteinu p21, inhibitoru cyklín dependentních kináz, díky čemuž dojde k zastavení buněčného cyklu. V případě úspěšné opravy DNA buňka pokračuje ve svém cyklu, při selhání oprav dojde k apoptóze. Proto by právě vysoká hladina proteinu p53 v buňkách TGCT mohla hrát velkou roli v obecně velmi velké úspěšnosti léčby, nicméně zde je nutno podotknout, že tato souvislost nebyla doposud prokázána. Dle Houldsworth et al., 1998 vzorky s mutovaným genem *TP53* vykazují větší chemorezistenci k cisplatině. Nicméně ani funkční protein p53 sám nezajistí správné fungování celého procesu až k apoptóze. Mimo p53 zde hraje důležitou roli výše zmíněný protein p21 a také negativní regulátor proteinu p53 – MDM2. Datta et al., 2001 zkoumali expresi všech těchto tří proteinů jak u neoplázií GCNIS, tak u invazivních nádorových buněk. Zjistili, že u všech vzorků docházelo k expresi proteinu p53, a to jak v případě neoplázií CGNIS, tak TGCT. Oproti tomu protein p21 byl exprimován v 67 % CGNIS a v invazivních nádorových buňkách se vyskytoval podstatně méně – expresi tohoto proteinu vykazovalo jen 11 % vzorků TGCT. Tento objev podporuje teorii, že právě ztáta exprese proteinu p21 by mohla přispívat k nádorové transformaci CGNIS v invazivní TGCT. Co se týče MDM2, zde byl vyzorován opačný trend, kdy byl exprimován signifikantně více v případě TGCT (47 %) na rozdíl od GCNIS (7 %). Proč k tomuto jevu dochází, zůstává stále otázkou. Vysoká chemosenzitivita buněk TGCT je spojována i s tím, že se tyto buňky nacházejí v nízkém stupni diferenciace. Mezi hlavní regulátory pluripotence patří *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* a *LIN28* (Gillis et al., 2011), které jsou svou funkcí úzce spojeny. V případě ztráty exprese *OCT3/4*, který mj. ovlivňuje i expresi výše zmíněného proteinu p21, nedochází k apoptóze poškozených buněk tak často, jak by mělo a buňky se stávají chemorezistentními (Mueller et al., 2006). Taylor-Weiner et al., 2016

poukazují právě na absenci exprese *OCT3/4* a také *NANOG* u chemorezistentních TGCT, ke které dochází vlivem ztráty heterozygosity.

Dalším často zkoumaným genem v souvislosti s cisplatinovou rezistencí u TGCT je gen *BRAF*, ovšem s velmi nejednoznačnými výsledky. *BRAF* je součástí RAS/MAPK signální dráhy ovlivňující růst buněk, jejich proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Honecker et al., 2009 publikovali výsledky studie chemorezistentních vzorků, u nichž se mutace v genu *BRAF* objevovala ve 26 %. Tyto výsledky ale nebyly potvrzeny následujícími studiemi, např. Masqué-Soler et al., 2012; Feldman et al., 2014 nenalezli ve zkoumaných vzorcích žádné mutace v genu *BRAF*.

Velmi zajímavá a nadějná studie Sakurai et al., 2020 byla publikována v roce 2020, kdy japonské vědci analyzovali vzorky napříč skoro všemi druhy TGCT (seminomy, neseminomy, nádory žloutkového váčku a teratomy). Zaměřili se konkrétně na gen *REV7*, který je ve varlatech vysoce exprimován a podílí se mj. na opravách DNA a regulaci buněčného cyklu. Autoři prováděli pokusy s buněčnými liniemi, kdy inaktivovali tento gen a pozorovali, jestli tato změna bude mít nějaký vliv na chemosenzitivitu buněk. U buněk s inaktivovaným genem *REV7* vyzorovali sníženou míru proliferace, zvýšenou frekvenci dvojitých zlomů DNA a vyšší frekvenci apoptózy – tyto události měly za důsledek větší chemosenzitivitu buněčných linií na cisplatinu, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Tyto výsledky ukazují, že *REV7* by mohl být potenciální terapeutický cíl pro pacienty s vytvořenou chemorezistencí.

Také gen *CCND1* kódující protein cyklin D1 představuje nadějný terapeutický směr. Noel et al., 2010 porovnávali expresi tohoto genu u chemosenzitivních (parentálních) a rezistentních buněčných linií, přičemž rezistentní linie vykazovaly podstatně vyšší expresi cyklinu D1. Zdá se tedy, že i dysbalance exprese genu *CCND1* by mohla být jedním z faktorů ovlivňujících vznik chemorezistence TGCT.

1.2.2. Metylace DNA

Jak již bylo zmíněno výše, seminomy a neseminomy se liší mj. svým metylačním vzorcem – seminomy vykazují nižší úroveň metylace, než neseminomy. Zároveň u seminomů vzniká méně často rezistence na cisplatinu. Ukazuje se, že tyto události jsou spolu vzájemně propojené – v experimentu s buněčnými liniemi seminomů rezistentních na cisplatinu Werman et al., 2010 sledovali snížení této rezistence při demethylaci buněk použitím 5-azacytidinu. Zjistili také, že demethylací buněčných linií došlo ke zvýšení exprese regulátorů pluripotence *OCT3/4* a *NANOG*, což podporuje zkoumanou hypotézu, že právě tyto regulátory se spolupodílejí na vzniku chemorezistence. Bisulfitovým sekvenováním, jenž nám umožňuje rozlišení

metylovaných a nemetylovaných cytosinů v DNA, došlo k objevení 14 000 míst v oblastech genů, které byly po ošetření 5-azacytidinu odlišně metylovány v porovnání s úrovní metylace před zahájením pokusu. Z nich autoři vytipovali několik genů, které by mohly hrát důležitou roli v získání chemorezistence – především tumor supresorový gen *KLF11* a protoonkogen *CFLAR*. Zde je zajímavé, že po expozici 5-azacytidinem došlo k hypometylaci (a tudíž by v těchto buňkách docházelo následně vyšší expresi) tumor supresorového genu *KLF11* a hypermetylaci (s následně nižší expresí) protoonkogenu *CFLAR*. Z toho se dá usuzovat, že 5-azacytidin by mohl představovat jeden z účinných terapeutických postupů po vzniku chemorezistence.

Studie zkoumající hypo/hypermetylaci promotorů jednotlivých genů v buněčných liniích TGCT byly publikovány již dříve, např. Koul et al., 2004 porovnávali metylaci promotorů několika desítek genů, kdy nejvýznamnější rozdíly u chemosenzitivních a rezistentních liniích našli u 4 genů: *RASSF1A*, *HIC1*, *MGMT* a *RARB*. S chemorezistencí je spojována hypermetylace prvních dvou uvedených – hypermetylace genu *RASSF1A* byla pozorována u 52 % rezistentních buněk oproti 28 % senzitivních, u genu *HIC1* byl poměr 47 % ku 24 %. Nepřekvapivě se jedná o tumor supresorové geny, jejichž exprese brání maligní transformaci buněk. U buněk senzitivních na cisplatinu našli vědci hypermetylované geny *MGMT* a transkripční faktor *RARB* v poměru 31 % ku 13 %, resp. 14 % k 0 % (zde obráceně v poměru senzitivní ku rezistentní). Gen *MGMT* kóduje O-6-metylguanin DNA metyltransferázu, enzym, který odstraňuje guanin-alkylový komplex, jenž vzniká působením cisplatinu a vede k destabilizaci DNA a apoptóze buněk; *MGMT* takto antagonizuje účinek cisplatinu na DNA. V případě hypermetylace tohoto genu tudíž dochází k větší citlivosti na cisplatinu.

Celkově můžeme říci, že zkoumání epigenomu TGCT přináší velmi zajímavé výsledky, které mají potenciál přispět k novým diagnostickým a terapeutickým postupům. Je ale za potřebí ještě hlubší pochopení této problematiky a studií, které budou potvrzovat dosavadní výsledky, aby mohlo dojít k uvedení některých poznatků do praxe.

1.3. Negenetické faktory

Nejenom genetické, ale i environmentální faktory a životní styl ovlivňují pravděpodobnost vzniku TGCT. To platí pro období před narozením, perinatální období i postnatální. Zde je třeba poukázat na to, že následující informace vycházejí z epidemiologických údajů a mohou být mírně zkreslené především v případě dotazníkových studií.

1.3.1. Prenatální a perinatální rizikové faktory

Cook et al., 2009 provedli jako první metaanalýzu 67 publikovaných článků věnovaným perinatálním analýzám rizikových faktorů pro výskyt TGCT. Zkoumali, zda věk matky, těžké nevolnosti během těhotenství, způsob porodu, zvýšené poporodní krvácení a fakt, jestli matka je prvorodička či nikoli může mít spojitost se vznikem TGCT. U věku matky a těžkých nevolností (které bývají spojovány se zvýšenou hladinou estrogenů) nebyly na rozdíl od ostatních zmíněných faktorů objeveny informace, které by poukazovaly na signifikantní spojitost s TGCT.

Coupland et al., 2004 poukazují – v rozporu s výše uvedenou metaanalýzou – na nízký věk matky jako rizikový faktor pro vznik TGCT. U matek, které rodily mezi 15. a 19. rokem života, byla dle této studie pravděpodobnost, že syn onemocní TGCT, dvojnásobná.

Jednoznačným rizikovým faktorem pro vznik TGCT je syndrom testikulární dysgeneze, který také často přispívá k horší prognóze onemocnění (Selvi et al., 2020). Mezi nejběžnější manifestace tohoto syndromu patří kryptorchismus (poruchy sestupu varlete do šourku), hypospadiie (vrozený rozštěp močové trubice na spodní straně penisu) a poruchy spermatogeneze a s tím spojená snížená plodnost (Skakkebaek et al., 2001). Vývojové poruchy urogenitálního traktu zahrnují i poruchy germinálních a stromálních buněk ve varlatech, což přispívá ke vzniku TGCT.

Syndrom testikulární dysgeneze bývá často spojován především s vystavením lidských plodů endokrinním disruptorům (látkám, které ovlivňují metabolismus steroidních hormonů) *in utero*. I přes to, že tento syndrom se může vyvinout na základě genetických faktorů, se předpokládá, že právě environmentální prostředí plodu má na vzniku syndromu signifikantně větší vliv (Skakkebaek et al., 2016). Mezi studované endokrinní disruptory v souvislosti s TGCT patří především xenoestrogeny (látky, které svými biologickými účinky napodobují estrogenu) – např. ftaláty a bisfenol A. Tyto látky se nachází v plastech a na základě studií na myších a krysách se uvažuje o zvýšeném riziku vzniku TGCT i u lidí především při expozici těchto látek *in utero* (Manikkam et al., 2013). Autoři poukazují také na signifikantně zvýšený

výskyt onemocnění varlat v třetí filiální generace (F3) a u první filiální generace (F1) na zvýšený výskyt onemocnění prostaty.

Teorii zvýšeného působení estrogenů na plod jakožto (spolu)příčinu vzniku TGCT podporují výše zmíněné záznamy těžkých nevolností během těhotenství u matek, a také to, že dle epidemiologických studií bývá zvýšené riziko u prvorodiček oproti několikanásobným matkám (Wanderås et al., 1998). To bývá vysvětlováno právě zvýšenou hladinou estrogenů během prvního těhotenství. I přes to, že jsou výsledky studií často nekonzistentní, recentní studie nevylučují možné působení estrogenů na plod a přiklání se k tomu, že má spolu s ostatními faktory svůj podíl v patofyziologii TGCT (Fénichel & Chevalier, 2019).

Dle Danjou et al., 2021 může i použití pesticidů ovlivňovat pravděpodobnost rozvoje TGCT. Tato studie zkoumala u 304 francouzských pacientů, zda byly v průběhu 1 roku před otěhotněním matky až do doby 1 roku po narození dítěte používány v domácnosti nějaké pesticidy. Výsledky ukazují na zvýšenou pravděpodobnost výskytu TGCT, konkrétně ne seminomů, při používání fungicidů v tomto období.

1.3.2. Postnatální rizikové faktory

Vzhledem k tomu, že kouření přispívá k mnoha nemocem včetně rakoviny, je jedním z často diskutovaných rizikových faktorů. Výsledky studií zabývajících se tímto tématem nejsou konzistentní – zatímco např. Pettersson et al., 2004 spojují zvýšené riziko TGCT s kouřením matky v průběhu těhotenství, McGlynn et al., 2006 zde nenachází žádnou souvislost. V čem se ale obě studie shodují je to, že zda kouří otec, nemá na výskyt TGCT vliv – z toho můžeme usuzovat, že pasivní kouření v době po narození by nemělo hrát v této problematice roli. Zajímavé je, že kouření marihuany bývá přímo spojované s jedním konkrétním typem TGCT, a to ne seminomy (Song et al., 2020).

Møller & Skakkebak, 1999 poukazovali již před více než 20 lety na spojitost TGCT a snížené plodnosti. Uvažují, že vzhledem k tomu, že od 2. světové války signifikantně stoupá výskyt TGCT a zároveň se snižuje mužská plodnost, by mohly být tyto dvě skutečnosti vzájemně propojené. Dnes již víme, že snížená plodnost snížená plodnost je signifikantně spojená se zvýšeným rizikem TGCT – je to jedním z důsledků syndromu testikulární dysgeneze, který byl zmíněn výše u výčtu prenatalních rizikových faktorů.

Jak bylo také zmíněno v předchozí kapitole, u *in situ* neoplázie GCNIS (prekurzoru TGCT) dochází k maligní transformaci do invazivního TGCT přibližně okolo puberty. Weir et al., 1998 zkoumali, zda věk, kdy se chlapci ocitnou v pubertě, má nějaký vliv na vznik onemocnění. Výsledky naznačují, že pozdější nástup puberty (ve studii zjišťován začátkem

růstu vousů, změny hlasu a růstového spurtu) je spjat s menším rizikem. Vzhledem k obecně se snižujícím věku v počátku puberty může být právě tento poznatek jedním z vysvětlení zvyšující se incidence TGCT.

S globálním nárůstem nadváhy a obezity byl zkoumán také vliv BMI jakožto rizikového faktoru. Studie se ale v tomto většinově shodují, že BMI incidenci TGCT neovlivňuje (Dieckmann & Pichlmeier, 2002; Markt et al., 2015). Oproti tomu výška se ukazuje jako zajímavý rizikový faktor. Dieckmann et al., 2008 poukazují na signifikantně vyšší riziko výskytu TGCT u mužů vyšších, než 185 cm. Hypotéza pro vysvětlení tohoto jevu je převážně ta, že za to může vysokokalorická strava (Armstrong & Doll, 1975) v období prvních dvou let života – kdy je z velké části určována výška v dospělosti.

1.4. Výskyt TGCT napříč populacemi

Přestože celosvětová incidence TGCT stále stoupá, incidence v jednotlivých zemích a světadílech se mnohdy velmi liší. Jak je vidět na Obrázku 1, nejvyšší incidenci TGCT dle WHO můžeme nalézt v Evropě, Severní Americe, jižní části Jižní Ameriky, Austrálii a Novém Zélandě. Oproti tomu v částech Asie a hlavně Afriky se výskyt TGCT pohybuje v významně menších číslech. Jedním faktorem je pravděpodobně problematický sběr a reportování relevantních dat z těchto oblastí – často jsou také ve studiích populace z těchto částí světa z tohoto důvodu opomíjeny. Obecně můžeme říci, že vysokou incidencí TGCT trpí převážně rozvinuté země západního světa – nabízí se tedy otázka, zda životní prostředí, ve kterém žijeme, a životní styl na tom má svůj podíl.



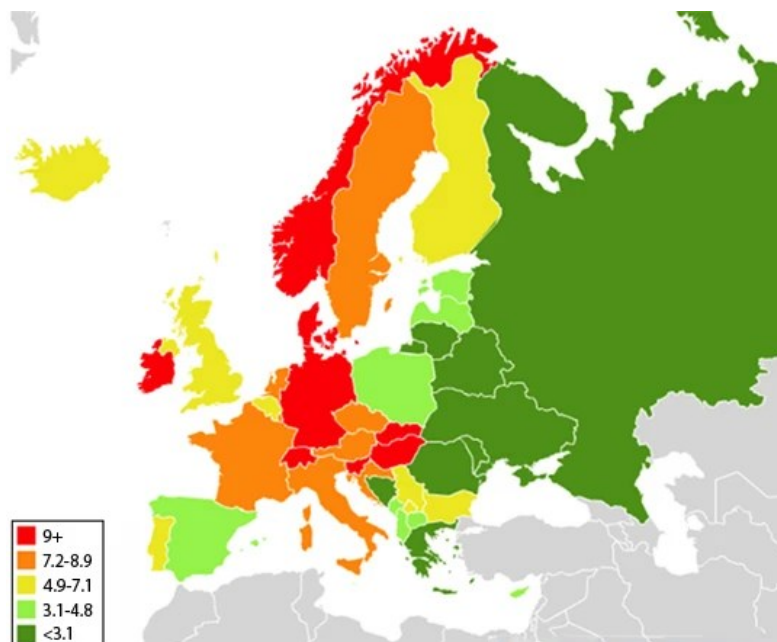
Obrázek 1: Výskyt TGCT ve světě. Jednotlivé barvy ukazují rozlišnou incidenci v jednotlivých zemích podle rámečku vlevo dole; čísla vztažena na 100 000 obyvatel. (GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, 2012. www.globocan.iarc.fr. Accessed 5 November 2014).

Zajímavá studie Cassim et al., 2021 se zabývala incidencí u Afričanů a Afroameričanů, tedy lidí pocházející ze stejného etnika žijících ve velmi odlišném prostředí. Výsledky potvrzují data z Obrázku 1, tedy že incidence TGCT u Afričanů je velmi nízká oproti Afroameričanům. Tento závěr poukazuje na životní prostředí a styl spolu s výměnou genů při sňatcích mezi různými etniky jako na jedny z klíčových faktorů ovlivňující počet nových případů. Teorii prostředí a moderního životního stylu jakožto spoluúčastníka vývoje TGCT potvrzuje i Levine et al., 2013, který studoval lékařské záznamy pořízené v letech 1960 až 2005 obržené od více než 1 milionu izraelských mužů před začátkem povinného vojenského výcviku. Vědci

poukazují na značný rozdíl ve výskytu TGCT, který se zvyšoval od mužů narozených v severní Africe a Asii (mimo Izrael), přes muže narozené v Izraeli, až po ty pocházející z Evropy. Výsledky ukazují také na statisticky významný rozdíl v incidenci TGCT již v případě první generace migrantů ze severní Afriky a Asie oproti těm, kteří se tam narodili.

Gurney et al., 2015 publikovali výsledky za použití dat z New Zealand Cancer Registry, kdy zjistili, že Maorové mají až o 80 % větší pravděpodobnost výskytu TGCT (z analýzy dat obdržených v letech 2000-2011) než ostatní populace, a to jak v případě seminomů, tak neseminomů. Takto velký rozdíl by mohl mít vliv na hlubší pochopení etiologie TGCT, nicméně příčiny této odlišnosti zatím zůstávají neobjasněny.

Při bližším pohledu na Evropu (Obrázek 2) můžeme lépe porovnat incidence v jednotlivých evropských zemích. Nejvyšší incidence můžeme pozorovat v severní části Evropy (Norsko, Dánsko), dále vyniká Francie, Švýcarsko a Irsko a v neposlední řadě také Slovensko, Maďarsko a Chorvatsko.



Obrázek 2: Výskyt TGCT ve Evropě. Jednotlivé barvy ukazují rozlišnou incidenci v jednotlivých zemích podle rámečku vlevo dole; čísla vztažena na 100 000 obyvatel. (GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, 2012. www.globocan.iarc.fr. Accessed 5 November 2014).

I přes to, že Dánsko představuje v současnosti jednu ze zemí se stále nejvyšší incidencí TGCT, data naznačují, že od roku 1990 se narozdíl od většiny ostatních zemí incidence snižuje (Richiardi et al., 2004). Důvody, proč by tomu tak mohlo být, ale zatím nejsou známy.

Znaor et al., 2020 předpokládá do roku 2035 mírně se snižující incidenci v dosud vysoce rizikových státech (již ve zmíněném Dánsku, dále Norsku, Švýcarsku a Rakousku) a zvyšující se trend ve výskytu TGCT v Pobaltských zemích a v zemích východní Evropy. Uvažuje tak na základě populačních změn v daných zemích (růst populací a jejich stárnutí) v kombinaci s rizikovými faktory.

Existence mezipopulačních odchylek ve výskytu TGCT je rozsáhlými studiemi potvrzený poznatek. Jeho vysvětlení je ale vcelku problematické, a to vlivem mnoha faktorů. Jedním z nich je migrace obyvatelstva, dále vzhledem k mnoha potenciálním rizikovým faktorům v patofyziologii TGCT je velmi těžké vytvořit takovou hypotézu, která by uspokojivě vysvětlovala všechny proměnné. Je potřeba dalšího výzkumu, aby mohly být alespoň částečně zodpovězeny otázky, které vyvstávají při sběru a analýze dat.

2. Cíl práce

Cílem této práce je nálezt v nádorových vzorcích pacientů s TGCT molekulární aberace, které mohou souviset s vývojem onemocnění nebo vznikem rezistence na cisplatinu, a které by mohly být využity pro nové léčebné postupy a cílenou biologickou léčbu.

3. Materiál a metody

Materiál pro náš výzkum představovalo 56 vzorků od 15 pacientů s relabujícími nebo rezistentními TGCT, kteří byli zařazeni do studií probíhajících na 2. LF UK a Fakultní Thomayerově nemocnici. Studie byly schváleny etickými komisemi nemocnic a všichni zařazení pacienti podepsali informovaný souhlas se studiem a zpracováním jejich vzorků. Jednalo se o pacienty, kteří absolvovali chemoterapii na bázi cisplatinu; vzorky viabilního nádoru po této léčbě proto představují nádorové buňky částečně nebo plně rezistentní na cisplatinu.

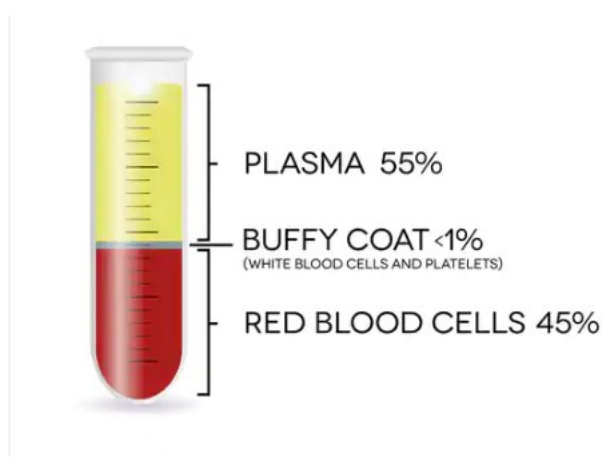
U všech pacientů byl vyšetřený původní nádor (před chemoterapií obsahující cisplatinu, tj. cisplatinu-senzitivní tumor), u 13 z nich také volná cirkulující DNA (cfDNA) a u 4 pacientů metastázy z období po chemoterapii obsahující cisplatinu (tj. cisplatinu-rezistentní). U některých pacientů jsme měli k dispozici i více vzorků metastáz nebo vzorků cfDNA – u 4 z nich jsme mohli analyzovat cfDNA odebranou při diagnóze a následně i v průběhu léčby. Pacienti byli diagnostikováni ve věku od 26 do 51 let, všichni byli v pokročilých klinických stádiích onemocnění – 2 nebo 3. Devíti z nich byl diagnostikován ne seminom a šesti seminom. Tři pacienti onemocnění podlehl (Tabulka 1).

ID	PN	cfDNA	Meta	gDNA	Histologický typ	Věk	KS	Stav
1					neseminom	42	2	PD, zemřel
2					neseminom	41	3	PD, zemřel
3					neseminom	28	2	CR
4					seminom	44	3	CR
5					seminom	34	2	CR
6					seminom	38	2	CR
7					neseminom	27	3	PD, zemřel
8					neseminom	38	2	CR
9					neseminom	42	3	PR
10					neseminom	29	3	PR
11					neseminom	34	3	PR
12					seminom	51	2	PR
13					seminom	26	2	CR
14					seminom	33	2	CR
15					neseminom	38	2	CR

Tabulka 1: Základní údaje o pacientech a typech vzorků. ID = identifikační číslo pacienta; PN = primární nádor; cfDNA = volná cirkulující DNA; Meta = metastáza; gDNA = germ-line DNA; Věk = věk v době diagnózy; KS = klinické stádium; PD = progrese; CR = kompletní remise; PR = částečná odpověď na léčbu

3.1. Izolace DNA

DNA z patientských vzorků jsme izolovali různými způsoby v závislosti na typu tkáně. Volná cirkulující DNA byla izolována z plazmy, nádorová DNA z primárních tumorů nebo metastáz z řezů tkáně zalitých v parafínu, germ-line DNA z monocytů periferní krve. Pro tyto účely byla krev odebraná pacientům do 1 hodiny po odběru centrifugována (2000 g, 5 minut), plazma alikvótována á 1 ml do eppendorfek, buffy coat bohatý na mononukleární leukocyty alikvótován á 500 μ l, a vše ihned zamraženo na -80 °C.



Obrázek 3: Schéma složek krve – shora dolů: plazma, buffy coat obsahující leukocyty a krevní destičky, červené krvinky (převzato z www.thermofisher.com)

3.1.1. Izolace cfDNA

Volná cirkulující DNA byla izolována ze vzorků plazmy za použití QIAamp Circulating Nucleic Acid kitu od firmy Qiagen. Principem metody je zachycení cfDNA na silikagelovou membránu v kolonce, opakované přečištění za použití vakuové odsávačky, aby byly odstraněny nečistoty a nakonec eluce (vyluhování) cfDNA z membrány.

V prvním kroku bylo napipetováno 100 μ l proteinázy K do 50ml zkumavky. Proteináza K rozštěpí bílkoviny v plazmě, která byla následně do zkumavky přidána (1 ml). Následně bylo přidáno 0,8 ml pufru ACL a celá směs byla inkubována v 60 °C po dobu 30 minut, aby došlo k denaturaci přítomných proteinů. Poté bylo přidáno 1,8 pufru ACB a směs byla inkubována na ledu po dobu 5 minut.

Lyzát byl přelit do QIAamp minikolonek, které byly předtím upevněny do systému OIAvac 24 Plus napojeném na vakuovou odsávačku. Následovalo přečištění cfDNA 600 μ l pufru ACW1, 750 μ l pufru ACW2 a 750 μ l 96% etanolu. Minikolonky byly dále zcentrifugovány (20 000 x g; 14 000 rpm) v čistých 2ml sběrných zkumavkách po dobu

3 minut. Minikolonky byly poté vloženy do nových sběrných zkumavek a inkubovány při 56 °C po dobu 10 minut.

Dále byly minikolonky vloženy do 1,5ml elučnicích zkumavek, bylo přidáno 35 µl elučního pufru AVE do centra silikagelových membrán v minikolonkách a proběhla inkubace po dobu 3 min v pokojové teplotě. Nakonec byly minikolonky v elučnicích zkumavkách zcentrifugovány (20 000 x g; 14 000 rpm) po dobu 1 minuty a cfDNA byla vyluhována do elučnicích zkumavek.

3.1.2. Izolace DNA z FFPE vzorků

FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) vzorky představují řezy tkáně (primárních tumorů a metastáz), které byly zafixovány pomocí formalínu a zalité do parafínu. Izolace DNA z těchto vzorků byla prováděna za použití QIAamp DNA FFPE Tissue kitu od firmy Qiagen. Podstatou této metody je deparafinizace vzorku pomocí deparafinizačního roztoku, lýza proteinů, zahřátí na 90 °C, aby byly odstraněny vazby (tzv. cross-links) nukleoproteinů vyvolané formalínem, odstranění deaminovaných cytosinových zbytků pomocí uracil-DNA glykosylázy, zachycení DNA na membránu, promytí a následná eluce DNA.

Nejprve byly vzorky skalpelem zbaveny přebytečného parafínu a přeneseny do 2ml zkumavek. Bylo přidáno 160 µl deparafinizačního roztoku, vzorky byly inkubovány v 56 °C po dobu 3 minut a následovalo zchlazení v pokojové teplotě. Bylo přidáno 55 µl Rnase-free vody, 25 µl pufru FTB a 20 µl proteinázy K, poté byly vzorky zvortexovány, zcentrifugovány a inkubovány v 56 °C po dobu 1 hodiny, aby došlo k lýze proteinů.

Následovala inkubace v 90 °C po dobu 1 hodiny – v tomto kroku byly odstraněny vazby nukleoproteinů vlivem formalínu. Vzorky byly zcentrifugovány a spodní čistá fáze roztoku byla přenesena do nové 2ml zkumavky. K roztoku bylo přidáno 115 µl Rnase-free vody. K odstranění deaminovaných cytosinových zbytků bylo přidáno 35 µl UNG (uracil-DNA glykosylázy), vzorky byly zvortexovány a inkubovány v 50 °C po dobu 1 hodiny.

Bylo přidáno 2 µl Rnázy A (100 mg/ml) a proběhla inkubace v pokojové teplotě po dobu 2 minut. Následně bylo přidáno 250 µl pufru AL a po zvortexování také 250 µl 96% ethanolu. Následovalo další zvortexování a centrifugace.

Lyzát byl přenesen do QIAamp minielučnicích zkumavek, vzorky byly zcentrifugovány při maximální rychlosti po dobu 1 minuty a tekutina obsahující pufr AL a AW1 byla vyhozena. Následovalo promytí 500 µl pufru AW1, 500 µl pufru AW2 a 250 µl 96% ethanolu. Nakonec byly minielučnicí zkumavky přeneseny do čistých 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek a doprostřed membrány bylo přidáno 30 µl pufru ATE. Proběhla inkubace v pokojové teplotě

po dobu 1 minuty a nakonec byly vzorky zcentrifugovány při maximální rychlosti po dobu 1 minuty a došlo k eluci DNA.

3.1.3. Izolace gDNA

K izolaci germ-line DNA z periferní krve (buffy coatu) byl použit QIAmp Blood Mini kit od firmy Qiagen. Podstata této izolace obdobně jak u cfDNA je založena na lýze proteinů obsažených ve vzorku, zachycení DNA na silikagelové membráně a následné několikanásobné přečištění, aby ve výsledné zkumavce byla jen čistá eluovaná DNA.

V prvním kroku bylo do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky napipetováno 200 μ l Proteinázy K a přidáno 200 μ l buffy coatu. Dále bylo přidáno 200 μ l pufru AL a po zvortexování proběhla inkubace v 56 °C po dobu 10 minut, kdy došlo k lýze proteinů. Poté bylo přidáno 200 μ l 96% ethanolu a vzorky byly znovu zvortexovány a zcentrifugovány. Obsah zkumavky byl přenesen do QIAmp mini spin kolonky (v 2ml sběrné zkumavce) a zcentrifugován (6 000 x g; 8 000 rpm) po dobu 1 minuty. Sběrné zkumavky s filtrátem byly vyhozeny a QIAmp mini spin kolonky byly přeneseny do nových 2ml sběrných zkumavek. QIAmp mini spin kolonky byly následně promyty 500 μ l promývacího pufru AW1 a 500 μ l promývacího pufru AW2.

Kolonky byly přeneseny do nových sběrných zkumavek a bylo přidáno 200 μ l destilované vody. Proběhla inkubace v pokojové teplotě po dobu 1 minuty, centrifugace (6 000 x g; 8 000 rpm) po dobu 1 minuty, kdy byla eluována DNA.

3.2. Fragmentace DNA

Vyizolovanou DNA je třeba rozštěpit na kratší úseky, které budou následně použity na přípravu knihoven, jež po dodatečné úpravě budou připraveny pro sekvenování nové generace. Pro fragmentaci DNA na úseky o 200 bp (párů bazí) byl použit ultrasonikátor Covaris S2 Focus.

Vzorky byly přendány z eppendorfek do kyvetek a stočeny v centrifuze. Kyvetky byly vkládány jednotlivě do ultrasonikátoru, kde došlo k naštěpení DNA pomocí ultrazvukových vln. Po dokončení programu byly vzorky znovu stočeny a přednány do nových eppendorfek.

3.3. Příprava knihoven

Z nafragmentovaných vzorků DNA byly dále vytvořené knihovny. Tento krok spočívá v úpravě přesahů na koncových částech vláken DNA vzniklých při fragmentaci, přidání deoxyadenosinu 5'-monofosfátu (dAMP) na 3' konec každého vlákna a poté ligaci adaptérů na konce vláken. Adaptéry představují oligonukleotidy obsahující primer pro následnou PCR reakce a také tzv.

barcode, který je unikátní pro každé vlákno DNA a umožňuje tedy identifikaci jednotlivých vláken. Pro přípravu knihoven byl použit Agilent HS XT Whole-Exome kit.

V prvním kroku byl připraven strip vzorků obsahující 10-200 ng DNA v 50 μ l. Dále byl připraven ligační master mix z 23 μ l ligačního pufru a 2 μ l T4 ligázy (množství uvedeno na 1 vzorek), který byl dán do pokojové teploty.

Následně byla připravena na ledu směs 16 μ l End Repair ATail pufru a 4 μ l EndA mixu (na 1 vzorek) a přidána do vzorků. Vzorky byly přendány do cycleru na níže uvedený program:

- 20 °C 15 minut
- 72 °C 15 minut
- 4 °C hold

Vzorky byly vyndány z cycleru na led a bylo do nich přidáno 25 μ l ligačního mixu a 5 μ l Adaptor Oligo mixu a následně opět vloženy do cycleru níže uvedený program:

- 20 °C 30 minut
- 4 °C hold

Do vzorků bylo přidáno 80 μ l AMPure kuliček a následně byly dvakrát promyty 70% ethanolem na stojánku s magnetem. Vzorky byly poté inkubovány 37 °C po dobu 1-3 minut, bylo přidáno 35 μ l RNase-free vody, následovala inkubace po dobu 2 minut a vzorky byly přeneseny na stojánek s magnetem.

Vzorky byly přendány do nového stripu, bylo do nich přidáno 13,5 PCR mixu (uveden níže) a 2 μ l index primeru, který slouží pro následnou identifikaci jednotlivých vzorků při sekvenování.

PCR mix byl připraven z (množství na 1 vzorek):

- 10 μ l Herculase pufru
- 0,5 μ l dNTP
- 2 μ l forward primeru
- 1 μ l Herculase polymerázy

PCR reakce proběhla v cycleru při následujícím programu:

- 98 °C 2 minuty
- 98 °C 30 sekund, 60 °C 30 sekund, 72 °C 1 minuta → 11x
- 72 °C 5 minut
- 4 °C hold

Po PCR reakci byly vzorky promyty pomocí 50 μ l AMPure kuliček a 70% ethanolu na stojánku s magnetem. Proběhla inkubace v 37 °C po dobu 1-3 minut bylo přidáno 15 μ l

RNase-free vody, následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 2 minut a vzorky byly přeneseny na stojánek s magnetem. Promyté vzorky byly následně přendány do nového stripu.

3.4. Úprava knihoven k sekvenování nové generace

Knihovny připravené v minulém kroku byly následně upraveny k sekvenování nové generace. V našem případě jsme prováděli celoxomové sekvenování, tudíž jsme hybridizovali všechny exomy v DNA s biotinylovanými próby, které byly následně zachyceny na streptavidinové kuličky pomocí Target Enrichment kitu od firmy Agilent. Zbylá DNA ve vzorcích, která se nezachytila na streptavidinové kuličky, byla odmyta.

Nejprve byl připraven strip vzorků obsahující 500-1000 ng DNA v 12 μ l. Dále byl vytvořen 25% RNase Block (1:3 RNase-free vody). Do vzorků bylo přidáno 5 μ l Low Input Blocker mixu a vzorky byly přeneseny do cycleru na program uvedený níže. Během prvních 15 minut, kdy byl puštěný cycler, byl připraven hybridizační mix, který se přidal do vzorků v 16. minutě programu a obsahoval 2 μ l 25% RNase Blocku, 5 μ l CapLib (hybridizační knihovny) a 6 μ l FH pufru (množství na jeden vzorek). V cycleru běžel následující program:

- 95 °C 5 minuta
- 65 °C 10 minut
- 65 °C 1 minuta → pauza: přidat 13 μ l hybridizačního mixu, vortex a vrátit zpátky
- 65 °C 1 minuta, 37 °C 3 sekundy → 60x
- 65 °C hold

Zatímco byly vzorky v cycleru, bylo třikrát promyto 50 μ l streptavidinových kuliček 200 μ l Binding pufru. Vzorky byly přendány z cycleru do stripu s promytými streptavidinovými kuličkami a dány na třepačku na 1 800 otáček po dobu 30 minut.

Po dokončení předchozího korku byly vzorky promyty 1x puftrem 1 a 6x puftrem 2 na stojánek s magnetem (během promývání puftrem 2 probíhala před dalším promytím vždy inkubace v cycleru při 70 °C po dobu 5 minut). Po odsátí posledního pufru bylo přidáno 25 μ l RNase-free vody a 25 μ l PCR mixu.

PCR mix byl připraven z (objemy na 1 vzorek):

- 12,5 μ l nuclease-free vody
- 10 μ l Herc II Rxn pufru
- 1 μ l DNA polymerázy
- 1 μ l post capture primer mixu

- 0,5 µl dNTP

Po přidání 25 µl RNase-free vody a 25 µl PCR mixu proběhla PCR reakce v cycleru na následující program:

- 98 °C 2 minuty
- 98 °C 30 sekund, 60 °C 30 sekund, 72 °C 1 minuta → 9x
- 72 °C 5 minut
- 4 °C hold

Po PCR reakci byl odsán supernatant a předán do nového stripu. Poté bylo do supernatantu přidáno 50 µl promývacích kuliček a vzorky byly dvakrát promyty 70% ethanolem na stojánku s magnetem. Nakonec bylo přidáno 25 µl RNase-free vody a vzorky byly přepipetovány do popsaných zkumavek.

3.5. Hodnocení kvality DNA

Kvalita DNA byla průběžně v celém procesu hodnocena spektrofotometricky pomocí přístroje Qubit a podrobněji také elektroforeticky na mikročipu firmy Agilent.

3.5.1. Spektrofotometrické hodnocení kvality DNA

Pro spektrofotometrické hodnocení kvality DNA byl použit přístroj Qubit firmy ThermoFisher Scientific. Byl připraven roztok pufru s reagentem (oranžové barvivo) v poměru 200:1. Do zkumavek bylo napipetováno 199 µl tohoto roztoku spolu s 1 µl vzorku. Pro zkumavky standardu 1 a 2 bylo použito 190 µl roztoku a 10 µl příslušného standardu.

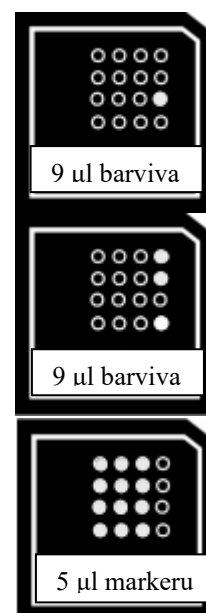
3.5.2. Elektroforetické hodnocení kvality DNA

Elektroforetické hodnocení kvality DNA probíhalo na High Sensitivity DNA čípech firmy Agilent.

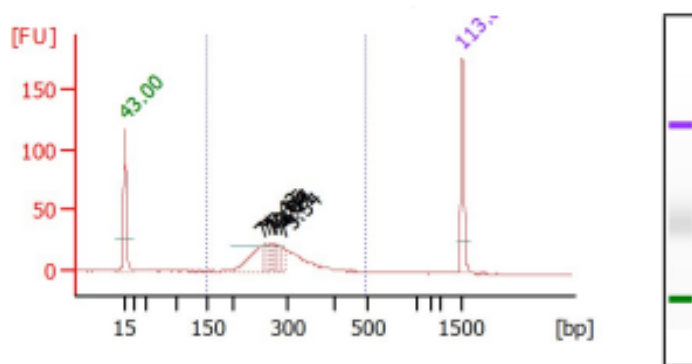
Nejprve byl zasazen čip do priming stanice, poté bylo napipetováno 9 µl barvicího gelového mixu do jamky označené "G".

Proběhla kontrola pístu, že je v pozici 1 ml a byla zavřena priming stanice; píst byl poté zatlačen dolů. Počkalo se 60 sekund a byl uvolněn píst. Poté se počkalo 5 sekund, píst byl dán zpátky do polohy 1 ml a bylo napipetováno se 9 µl barvicího gelového mixu do zbylých jamek v sloupci.

Následně bylo napipetováno 5 µl High Sensitivity DNA markeru do zbylých jamek, 1 µl High Sensitivity DNA žebříku do jamky 15 a 1 µl vzorků do jamek 1-3, 5-7, 9-11 a 13-15.



Po dokončení programu na přístroji byly zkontrolovány výstupy jednotlivých vzorků – jestli se v nich nachází dostatečně vysoká koncentrace DNA o odpovídajících délkách fragmentů (viz níže).



Obrázek 4: Grafický výstup elektroforetického hodnocení kvality DNA na mikročipu Agilent (vzorek metastázy). Na ose X jsou vyznačeny hodnoty párů bází, na ose Y hodnoty koncentrace ve formě fluorescenčních jednotek. Vpravo je grafické znázornění na gelu.

3.6. Celoxomové sekvenování

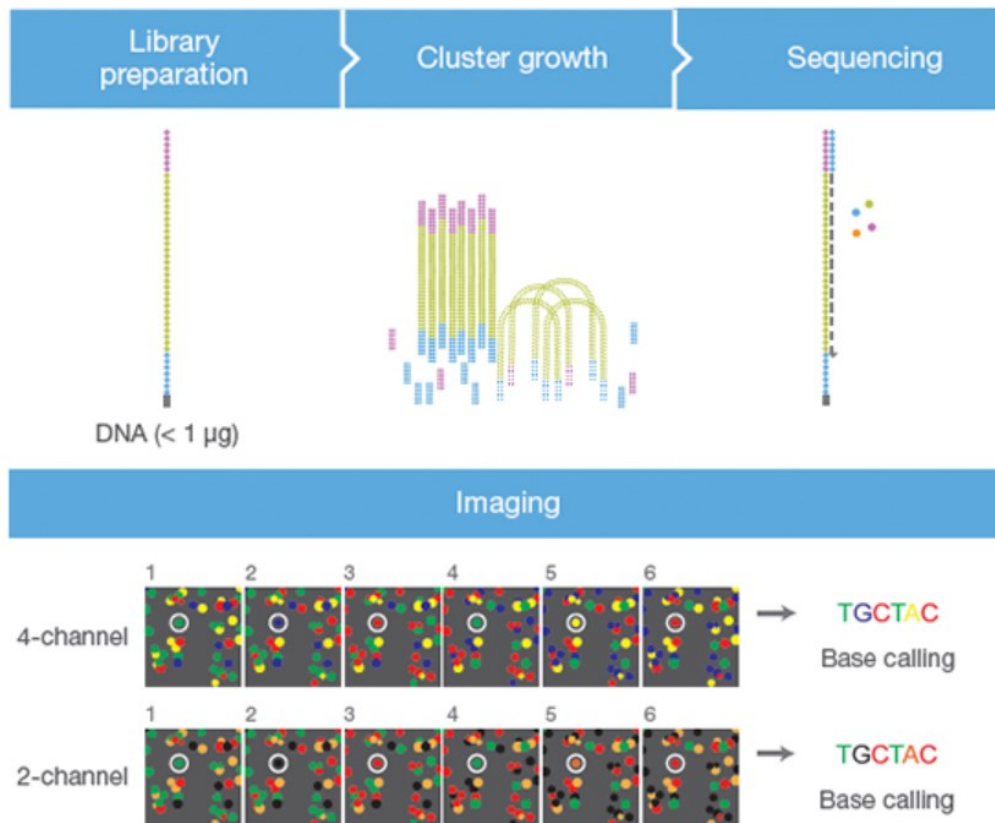
Upravené vzorky k sekvenování byly naředěny na 4nM koncentraci. Dále byl připraven 0,2nM roztok NaOH a naředěné vzorky byly smíchány s tímto roztokem v poměru 1:1 (5 μ l naředěných vzorků a 5 μ l roztoku NaOH).

Do směsi bylo přidáno 5 μ l trisHCl a 985 μ l pufru HT1 (do objemu 1 ml). Následně byl vytvořen finální 1,8pM roztok, tj. 117 μ l roztoku z předchozího kroku a 1183 μ l pufru HT1. Tento roztok byl přenesen do flow cell a vložen do přístroje Illumina NextSeq 500 k celoxomovému sekvenování.

Vzorky byly sekvenovány na principu sekvenování pomocí syntézy (viz Obrázek 5). Při této metodě sekvenování jsou jednotlivé fragmenty DNA zachyceny na oligonukleotidy nacházející se na dně flow cell. Tyto oligonukleotidy jsou komplementární k části barcodu – oligonukleotidu napojeného na jednotlivá vlákna DNA. Pomocí DNA polymerázy dojde k vytvoření nových vláken DNA, které jsou komplementární k templátovým vláknům zachycených na oligonukleotidech ve flow cell.

Templátová vlákna jsou poté odmyta a dochází k vytvoření klastrů pomocí tzv. bridge amplifikace. Po této amplifikaci jsou odmyta zpětná vlákna DNA a začíná sekvenování předních (forward) vláken. Jednotlivé nukleotidy inkorporované do nově vznikajících vláken DNA jsou značeny fluorescenčními barvami, které jsou detekovány sekvenačním přístrojem, jenž na základě emitované barvy rozpozná, jaké báze se přidaly do nově vytvářených vláken DNA. Báze mohou být značeny 4 barvami, tedy každá báze nese svou vlastní barvu, nebo (jako v našem případě) byly značeny kombinací pouze 2 barev. V tomto případě jsou dvě báze

značené odlišnými barvami, třetí nese kombinaci těchto barev a čtvrtá žádnou barvu. Po přečtení předních vláken DNA jsou templáty odmyty a následuje obdobné sekvenování zpětných vláken.



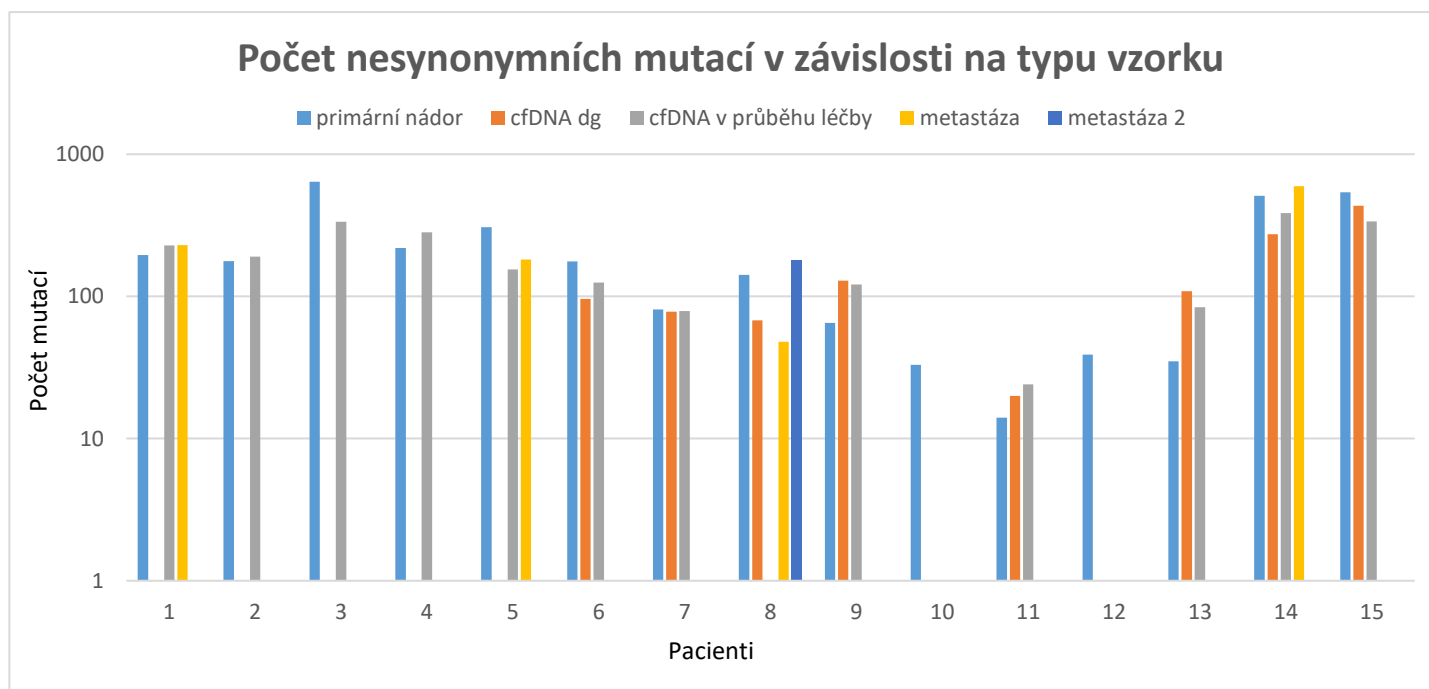
Obrázek 5: Sekvenování pomocí syntézy. V horní části (zleva) vlákno DNA s barcody na obou koncích komplementární k oligonukleotidům ve flow cell; hybridizace vláken DNA ve flow cell, tvorba klastrů a bridge amplifikace; sekvenování vlákna DNA pomocí syntézy. V dolní části detekce fluorescenčních barev jednotlivých bází sekvenačním přístrojem (nahore při použití 4 barev a dole při použití kombinací 2 barev). Převzato z www.illumina.com.

4. Výsledky

Primární výsledky sekvenování (hrubá data) byla dále zpracována pomocí bioinformatických pipeline, byla provedena kontrola kvality sekvenování a zjištěny varianty v porovnání s referenčním genomem. Tyto výsledky byly dále zpracovány v programu Microsoft Excel, kde jsme analyzovali molekulární aberace jednotlivých pacientů. Analyzovali jsme celý exom – tedy část genomu tvořené exony, které jsou dále transkribovány do mRNA.

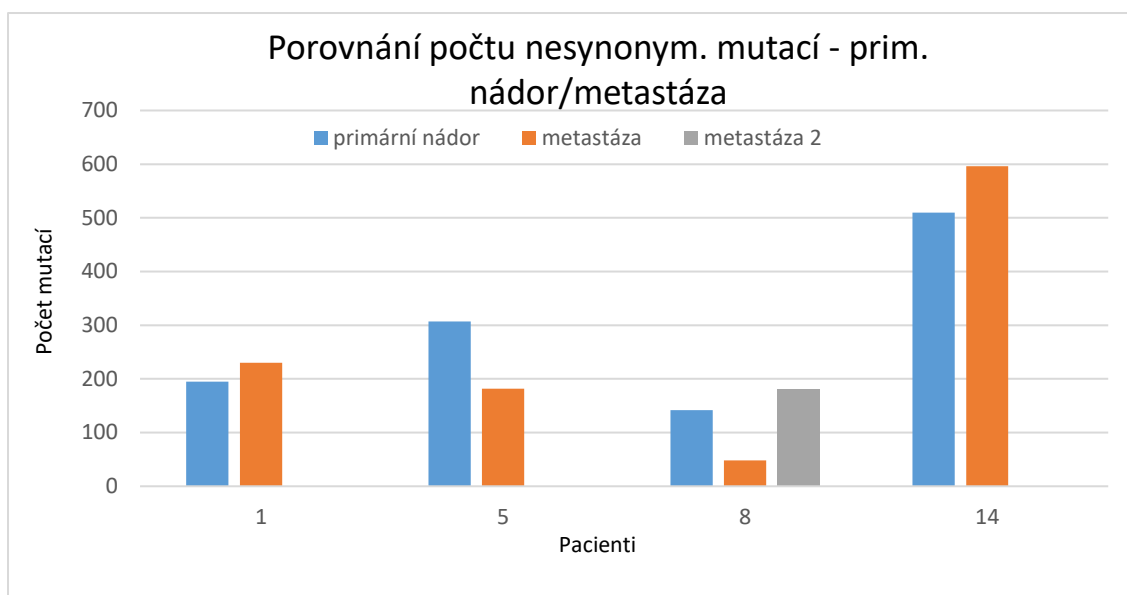
4.1. Analýza počtu mutací v jednotlivých typech vzorků

V rámci analýzy jsme odfiltrovali synonymní mutace tj. ty, které nezapříčiňují záměnu aminokyseliny v následující transkripci do mRNA a nejsou tedy tolik klinicky významné. Níže je uvedeno grafické zpracování počtu nesynonymních mutací, které se nacházely v jednotlivých typech vzorků.



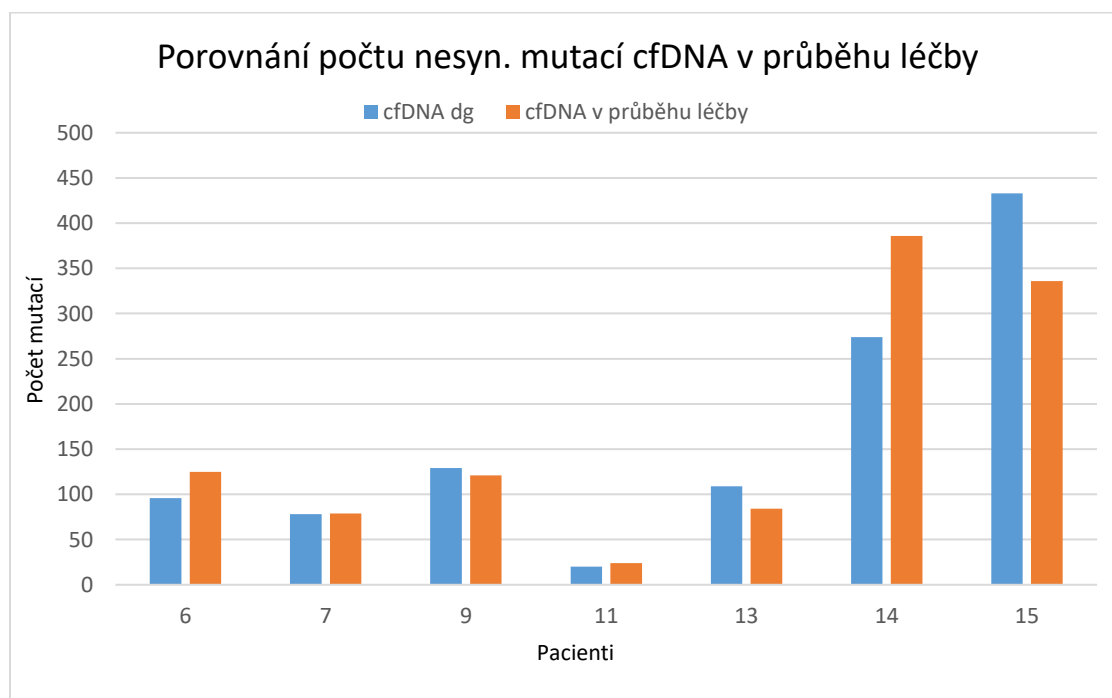
Graf 3: Počet nesynonymních mutací v závislosti na typu vzorku (zlogaritmováno). Osa X představuje jednotlivé pacienty, osa Y počet mutací. cfDNA dg = volná cirkulující DNA odebraná v době diagnózy.

Zajímalo nás, jestli se liší počet nesynonymních mutací v průběhu progresu onemocnění. Porovnali jsme tedy počet mutací ve vzorcích primárních nádorů a metastáz. Jak je vidět na grafu níže, nelze z údajů, které nám vyšly, pozorovat nějakou korelaci co se týče počtu nesynonymních mutací a progresu onemocnění.



Graf 4: Porovnání nesynonymních mutací u vzorků primárních nádorů a metastáz. Osa X znázorňuje identifikační čísla pacientů, osa Y počet nesynonymních mutací.

Obdobně jsme se dívali na počet nesynonymních mutací u cfDNA – jak se liší počty u cfDNA při diagnóze a cfDNA odebranou v průběhu onemocnění. Stejně jako u porovnávání počtu mutací u primárních nádorů a metastáz, ani zde jsme neobjevili žádnou korelaci v počtu nesynonymních mutací v závislosti na průběhu onemocnění.



Graf 5: Porovnání nesynonymních mutací u vzorků cfDNA odebraných při diagnóze oproti vzorkům cfDNA odebraných v průběhu onemocnění. Osa X znázorňuje identifikační čísla pacientů, osa Y počet nesynonymních mutací.

Narozdíl od primárních nádorů a metastáz, u kterých jsou vzorky tvořené vyizolovanou DNA z řezů tkáně s maximálním zastoupením nádorových buněk (minimálně 80 %), cfDNA koluje v krevním řečišti a její koncentrace se v průběhu onemocnění mění – při úspěšnosti léčby klesá, při progresi onemocnění naopak vykazuje opačný trend.

4.2. Analýza jednotlivých genů

Dále jsme hledali ty nesynonymní mutace již u konkrétních genů, které by mohly být významné pro vznik a vývoj TGCT a vzniku rezistence na cisplatinu. Odfiltrovali jsme ty mutace, které se vyskytují v germ-line DNA (tedy v DNA „zdravých“ normálních buněk) a hledali somatické mutace unikátní pro primárních nádory, nádorovou cfDNA a metastázy.

Při hodnocení byla vždy dodržována následující kritéria:

- Lokus, ve kterém došlo k mutaci, musel být vždy přečten sekvenačním přístrojem alespoň 3x.
- Celkově musel být daný lokus přečten alespoň 5x.
- Mutace se v nádorovém vzorku vyskytla s frekvencí aspoň 5 %.
- Mutace se nenacházela v germ-line DNA.

Vyfiltrované aberace byly dale hodnocené dle jejich popisovaného významu v etiopatogenezi nádorů nebo testikulárním vývoji. Níže je uvedeno 9 genů, které byly mutované u více pacientů ve vyšších frekvencích a u kterých tak lze očekávat funkční a klinický význam: *RBMX* 31 %, *TPTE2* 17 %, *PRAMEF8* 19 %, *TSPAN16* 7 %, *CDC27* 12 %, *PRDM9* 9 %, *DNAH12* 5 %, *ANKRD30A* 15 % a *HGC6.3* 12 % (procenta udávají počty vzorků s danou mutací ze všech vyšetřených vzorků – viz Graf 6).



Graf 6: Procentuální zastoupení nesynonymních mutací v analyzovaných nádorových vzorcích. Na ose X jsou vyneseny jednotlivé geny a na ose Y počet vzorků, ve kterých byla přítomná mutace daného genu – vyjádřeno v procentech ze všech vzorků.

4.2.1. RBMX

Gen *RBMX* se nachází na chromozomu X a je homologem genu *RBMX* vyskytující se na chromozomu Y, který patří mezi regulátory spermatogeneze. Uvádí se, že ke vzniku tohoto homologu došlo před více než 130 miliony lety mezi protochromozomy X a Y (Delbridge et al., 1999). Sám gen *RBMX* se podílí na udržování genomové stability a není exprimován výhradě ve varlatech, na rozdíl od *RBMX*.

U 3 pacientů jsme objevili mutace v tomto genu ve všech dostupných typech nádorových vzorků, přičemž v kontrolním vzorku germ-line DNA se mutace nenacházely. U pacienta č. 15 můžeme vidět, že mutace v primárním nádoru nebyla detekována, ale byla nalezná v cfDNA při diagnóze a v průběhu léčby se četnost této mutace ještě zvýšila. Gen *RBMX* by tudíž mohl mít vliv jak na vývoj TGCT, tak na vzniku rezistence na cisplatinu.

RBMX - RNA Binding Motif protein X-linked							
pac.	aberce	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
1	chrX 135960119 C→T	missense	20 %	40 %	-	31 %	0 %
3	chrX 135960119 C → T	missense	33 %	-	-	31 %	0 %
	chrX 135957672 A→ T	missense	40 %	-	-	42 %	0 %
4	chrX 135957690 A → G	missense	38 %	-	-	45 %	0 %
	chrX 135957699 C → T	missense	26 %	-	-	36 %	0 %
15	chrX 135960230 C → T	missense	0 %	-	20 %	50 %	0 %

Tabulka 2: Mutace v genu *RBMX*. Sloupec “aberce” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

4.2.2. TPTE2

TPTE2 je jedním z recentně objevených kandidátních genů podílející se na pohyblivosti spermií, který se také pravděpodobně podílí na mužské neplodnosti (Alikhani et al., 2013). Tento gen kóduje enzym fosfatázu účastnící se buněčné signalizace (protein tyrosin fosfatázová aktivita) a k jeho expresi dochází výhradně ve varlatech. Dle našich výsledků se u 3 pacientů objevily missense mutace v tomto genu ve vysoké míře jak při diagnóze, tak i v průběhu onemocnění.

TPTE2 - Transmembrane Phosphoinositide 3-phosphatase and Tensin homolog 2							
pac.	aberce	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
1	ch13 20066994 T→ C	missense	39 %	44 %	-	58 %	0 %
3	chr13 20067011 A → C	missense	24 %	-	-	21 %	0 %
4	chr13 20066994 T→ C	missense	54 %	-	-	42 %	0 %

Tabulka 3: Mutace v genu *TPTE2*. Sloupec “aberce” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

4.2.3. PRAMEF8

PRAMEF8 patří do genové rodiny *PRAME*. K expresi genů této rodiny dochází za normálních podmínek dle současných genomových studií téměř výhradě ve varlatech. Předpokládá se, že gen *PRAMEF8* negativně ovlivňuje apoptózní procesy a zvyšuje proliferaci buněk. Objevili jsme missense mutace v tomto genu napříč nádorovými vzorky u 2 pacientů.

PRAMEF8 - PRAME family member 8							
pac.	aberrace	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
4	chr1 12979685 T → C	missense	25 %	-	-	31 %	0 %
11	chr1 12980099 G → C	missense	20 %	-	30 %	29 %	0 %
	chr1 12980096 G → T	missense	24 %	-	30 %	29 %	0 %

Tabulka 4: Mutace v genu PRAMEF8. Sloupec “aberrace” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

4.2.4. TSPAN16

Gen *TSPAN16* kóduje transmembránový protein tvořený 4 hydrofobními doménami. Tento gen zprostředkovává signální transdukce, jež ovlivňují regulaci buněčného cyklu, proliferaci, růst a pohyblivost buněk. Exprese tohoto genu je spojována výhradně s varlaty. Mutaci v tomto genu jsme zaznamenali pouze u jednoho pacienta, nicméně vzhledem k funkci tohoto genu, procentuálnímu zastoupení této mutace a recentnímu objevu spojujícímu *TSPAN16* s mužskou neplodností (Omolaoye et al., 2022) se domníváme, že by mohl hrát důležitou roli ve vývoji TGCT.

TSPAN16 - Tetraspanin 16							
pac.	aberrace	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
5	ch19 11437480 C → G	missense	73 %	73 %	-	57 %	0 %

Tabulka 5: Mutace v genu TSPAN16. Sloupec “aberrace” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

4.2.5. CDC27

Gen *CDC27* patří mezi tumor supresorové geny a regulátory buněčného cyklu. Jeho produkt interaguje s checkpoint proteiny, které dohlížejí na to, aby dělicí vřetenko bylo řádně sestaveno a buňka vstoupila do anafáze mitózy ve chvíli, kdy jsou všechny chromozomy správně seřazeny v ekvatoriální rovině. *CDC27* byl poprvé publikován jako potenciální onkogenetický faktor u TGCT v roce 2015 (Litchfield et al., 2015), kdy vědci objevili mutace v tomto genu u 11,9 % vzorků. My jsme našli tuto mutaci v 12 % vzorků – u 2 pacientů. U obou pacientů se jednalo o missense mutaci na identickém místě, kdy došlo k záměně guaninu za cytosin.

CDC27 - Cell Division Cycle 27							
pac.	aberrace	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
1	chr17 45234303 G → C	missense	5 %	22 %	-	5 %	0 %
3	chr17 45234303 G → C	missense	25 %	-	-	15 %	0 %

Tabulka 6: Mutace v genu *CDC27*. Sloupec “aberrace” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

4.2.6. PRDM9

PRDM9 kóduje zinc finger protein (jehož charakteristická stavba umožňuje rozpoznání specifických sekvenčních motivů DNA), který se vyznačuje histon metyltransferázovou aktivitou. Katalyzuje metylaci histonů H3 během profáze meiózy a určuje místa rekombinačních hotspotů (Feichtinger & McFarlane, 2019). K jeho expresi dochází převážně ve varlatech. Uvažuje se, že právě mutace v tomto genu mohou zapříčinit neplodnost u mužů (Fang et al., 2022). My jsme mutace *PRMD9* našli ve 3 cfDNA vzorcích u 2 pacientů (u pac. 3 jsme našli 2 různé mutace v jednom vzorku cfDNA), přičemž v primárních tumorech se nenacházela. To naznačuje, že může souviset s generalizací onemocnění a vznikem rezistence na léčbu, a *PRDM9* je tak kandidátním genem hrajícím roli ve vzniku rezistence na cisplatinu u TGCT.

PRDM9 - PR/SET domain 9							
pac.	aberrace	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
3	chr5 23527640 A → G	missense	0 %	-	-	12 %	0 %
	chr5 23527649 C → A	missense	0 %	-	-	10 %	0 %
7	chr5 23527721 C → A	missense	0 %	-	9 %	7 %	0 %

Tabulka 7: Mutace v genu *PRDM9*. Sloupec “aberrace” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

4.2.7. DNAH12

DNAH12 je gen s ATPázovou aktivitou umožňující pohyb molekul podél mikrotubulů. Není tkáňově specifický, ale díky své funkci se podílí mj. na pohyblivosti spermií (Pereira et al., 2017). Mutaci v tomto genu jsme našli ve velké míře v obou nádorových

vzorcích u jednoho pacienta, a to jak v primárním nádoru, tak i v cfDNA získané v průběhu léčby. Při studiu literatury jsme mutaci *DNAH12* spojenou s TGCT doposud nenašli, nicméně vzhledem k funkční podobnosti s několika geny zmíněnými výše, které jsou již s vývojem TGCT spojovány, považujeme za důležité tento gen do našich výsledků zařadit.

DNAH12 - Dynein Axonemal Heavy chain 12							
pac.	aberrace	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
4	chr3 57386148 C → G	missense	42 %	-	-	67 %	0 %

Tabulka 8: Mutace v genu *DNAH12*. Sloupec “aberrace” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

4.2.8. ANKRD30A

Gen *ANKRD30A* kóduje transkripční faktor vázající se na DNA, který je exprimován výhradně v prsní tkáni a varlatech, kde je specificky demetylován (Wu et al., 2013). Změny exprese v tomto genu jsou spojovány s progresí rakoviny prsu (Milioli et al., 2015), nicméně u TGCT tato spojitost zatím publikována nebyla. Vzhledem k tomu, že jsme mutace v genu *ANKRD30A* našli v 14 % nádorových vzorcích s 0 % přítomností v kontrolní germ-line DNA, považujeme i tento gen za jeden z potenciálních kandidátních genů pro vývoj TGCT.

ANKRD30A - Ankyrin repeat domain 30A							
pac.	aberrace	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
4	chr10 37430914 T → G	missense	13 %	-	14 %	-	0 %
13	chr10 37436349 T → C	missense	36 %	-	-	-	0 %
15	chr10 37505192 C → T	missense	86 %	-	50 %	36 %	0 %

Tabulka 9: Mutace v genu *ANKRD30A*. Sloupec “aberrace” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

4.2.9. HGC6.3

HGC6.3 je prozatím necharakterizovaný RNA gen, který byl v již v roce 1999 publikován v souvislosti s rakovinou vaječnicků, kdy byly v nádorových vzorcích nalezeny tandemové repetice VNTR v tomto genu (Minaguchi et al., 1999). Spojitost *HGC6.3* s TGCT jsme zatím

v literatuře nenašli, nicméně jsme tuto mutace objevili v 12 % nádorových vzorcích, přičemž pac. 2 s frameshift mutací (která narozdíl od missense mutace mění celý čtecí rámec) onemocněl podlehl, což naznačuje možnou funkční významnost této aberace.

HGC6.3 - uncharacterized LOC100128124							
pac.	abrace	charakter	PN	meta	cfDNA dg	cfDNA léč.	kontrola gDNA
2	chr6 20296385 A → AGT	frameshift	10 %	-	-	16 %	0 %
6	chr6 168377220 T → G	missense	8 %	-	16 %	15 %	0 %

Tabulka 10: Mutace v genu *HGC6.3*. Sloupec “abrace” představuje umístění daného lokusu v rámci chromozomu a změnu báze/bází; PN = primární nádor; meta = metastáze; cfDNA dg = volná cirkulující DNA při diagnóze; cfDNA léč. = volná cirkulující DNA v průběhu léčby; gDNA = germ-line DNA; pomlčka = nebyl k dispozici vzorek

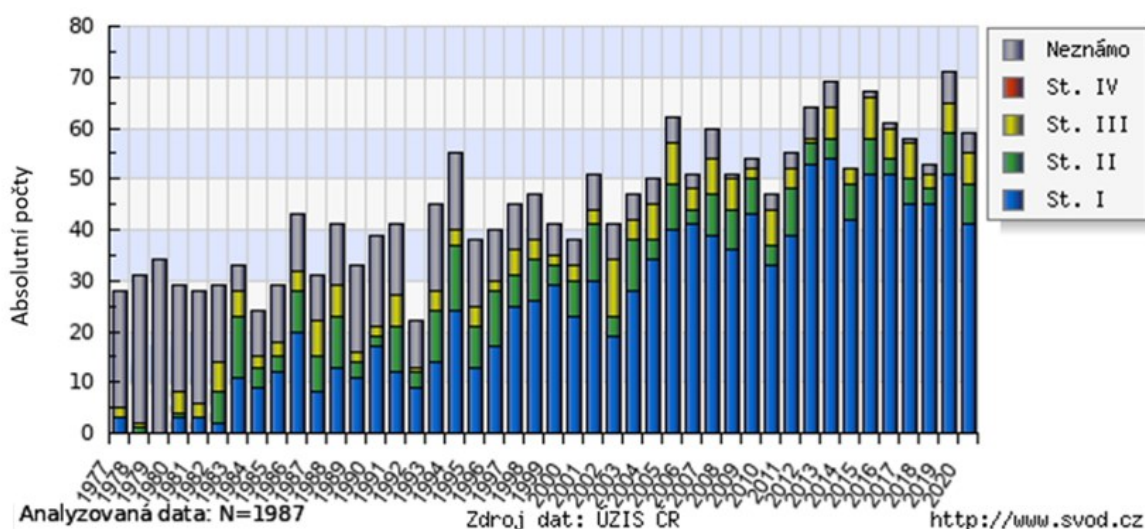
5. Diskuze

Cílem této práce bylo indentifikovat molekulární aberace patientských vzorků TGCT, které se mohou podílet na vývoji onemocnění a vzniku cisplatinové rezistence. Molekulární charakteristika vývoje TGCT i vznik cisplatinové rezistence jsou aktuální onkologická témata, u kterých stále dochází k novým objevům. Především mechanismus vzniku cisplatinové rezistence u TGCT je stále dodnes relativně málo známý. Komplexní pochopení této problematiky by mělo nabídnout teoretické podklady k vytvoření cílené biologické léčby, zlepšení diagnostických technik a prognózy u pacientů s pokročilým TGCT.

Buňky TGCT jsou vysoce senzitivní na chemoterapii na bázi cisplatinu, a to patrně díky svému původu, na základě kterého si uchovávají částečně embryonální charakter. U části nádorů ale dochází ke ztrátě této senzitivity, přičemž příčiny tohoto jevu jsou prozatím neobjasněné. Uvažuje se především o úloze výše zmíněných regulátorů pluripotence *OCT3/4* a *NANOG* a také spojitosti s epigenetickými změnami, především metylací DNA.

Náš materiál se sestával z 56 vzorků od 15 pacientů. U každého pacienta jsme měli k dispozici vzorek primárního nádoru a kontrolní germ-line DNA. U 13 pacientů jsme měli alespoň jeden vzorek cfDNA, u 4 z nich jsme mohli analyzovat cfDNA odebranou při diagnóze a následně i v průběhu léčby. 4 z celkového počtu pacientů se vytvořily metastázy. Neúplný soubor cfDNA dat byl tedy jedním z limitujících faktorů naší analýzy, především díky chybějícím vzorkům cfDNA v době diagnózy. Počet 15 pacientů je do určité míry také limitující, nicméně jak bylo zmíněno v kapitolách výše, jen malá část diagnostikovaných pacientů se nachází v pokročilých stádiích onemocnění a z nich pouze cca 10 % je rezistentních na cisplatinu. Když tyto počty vztáhneme na populaci Prahy, vyjdou nám pouze jednotky pacientů vhodných k zařazení do studie (viz Graf 7).

Výsledkem našeho výzkumu je především identifikace 9 kandidátních genů pro vývoj TGCT a/nebo vzniku cisplatinové rezistence – *RBMX*, *TPTE2*, *PRAMEF8*, *TSPAN16*, *CDC27*, *PRDM9*, *DNAH12*, *ANKRD30A* a *HGC6.3*. S vývojem onemocnění spojujeme především geny *RBMX*, *TPTE2*, *PRAMEF8*, *TSPAN16*, *CDC27*, *DNAH12*, *ANKRD30A* a *HGC6.3*, se vznikem cisplatinové rezistence především *PRDM9* a dále také *RBMX*. Většina z těchto genů je spojovaná s normálním vývojem a/nebo funkcí varlat, ale zatím jen jediný (*CDC27*) byl identifikovaný v souvislosti s jeho možnou rolí v patogenezi TGCT. Některé z těchto genů byly dále dány do souvislosti s infertilitou, která může mít s TGCT podobnou etiopatogenezi ve smyslu syndromu testikulární dysgeneze (geny *TPTE2*, *TSPAN16* a *PRDM9*) nebo v souvislosti s jiným nádorovým onemocněním (nádory ovaria – gen *HGC6.3*).



Graf 7: Vývoj zastoupení klinických stádií TGCT vztahovaný pouze na obyvatele Hl. m. Prahy. (převzato z www.svod.cz)

Identifikace mutací v tumor supresorovém genu a regulátoru buněčného cyklu *CDC27* je v souladu se studií Litchfield et al., 2015, ve které byly missense mutace v tomto genu objeveny v 12 % vzorků, stejně jako v našem výzkumu.

Námi objevené mutace v genu *PRDM9* jsou zajímavé také v souvislosti se studií Lambrot & Kimmins, 2011. V této studii byla spojována abnormální exprese transkripčního faktoru a regulátoru pluripotence *OCT3/4* podílejícího se na vzniku TGCT a tumor supresorového genu *RASSF1A* v souvislosti s aberantní metylací histonů H3. Je to právě gen *PRDM9*, který katalyzuje metylaci histonů H3 během profáze meiózy a určuje místa rekombinačních hotspotů. Z toho vyplývá, že námi objevené missense mutace v genu *PRDM9* by mohly mít přímý dopad na následnou abnormální expresi *OCT3/4* a *RASSF1A*.

Naše výsledky se sestávají z identifikace 9 zajímavých kandidátních genů, přičemž minimálně u některých z nich lze předpokládat přímý patogenetický význam, a tudíž i možný dopad na klinickou praxi. Do výzkumu plánujeme zařadit v budoucnu další pacienty, abychom mohli pracovat s větším souborem dat a výsledky následně ověřit v klinických studiích. V plánu jsou i další analýzy, jako např. metylační analýza, aby bylo možné pozorovat v nádorových buňkách i epigenetické změny, u kterých se ukazuje, že mohou mít také signifikantní vliv na diagnózu a léčbu. V neposlední řadě plánujeme experimentálním výzkum na buněčných liniích TGCT a jejich CRISPR/Cas9 knockout screening, během kterého budou buňky vystavené cisplatině. Data z CRISPR/Cas9 knockout sekvenování by měla přinést nové

informace o genech, které jsou zapojeny do vzniku cisplatinové rezistence, a jejich terapeutické ovlivnění by tudíž mohlo poskytnout efektivní léčebný přístup pro pacienty s pokročilými a rezistentními TGCT.

6. Závěr

Testikulární germinální nádory (TGCT) představují vzhledem k jejich celosvětově vzrůstající incidenci velmi aktuální výzkumné téma. Jsou to nejčastější solidní nádory mladých mužů ve věku 18-35 let, které sice obecně velmi dobře reagují na léčbu cisplatinou, ale u části pacientů dochází k vytvoření rezistence na toto cytostatikum, a pro tyto potom není k dispozici žádná účinná léčba.

Pro molekulární charakteristiku TGCT je typická především amplifikace krátkého raménka 12. chromozomu. Častými aberacemi jsou mutace v genech např. *KIT*, *KRAS/NRAS* a transkripčních faktorech *NANOG* a *OCT3/4*. Doposud bylo indentifikováno mnoho dalších kandidátních genů i epigenetických změn v rámci vývoje TGCT, nicméně tyto objevy potřebují ještě další validaci. Obdobně i pro vznik cisplatinové rezistence platí to, že její molekulární charakteristika je doposud relativně málo probádaný jev, pracuje se s mnoha kandidátními geny a z epigenetických faktorů především s metylací DNA.

Z toho důvodu si tato práce kladla za cíl prostřednictvím celoexomového sekvenování 56 vzorků získaných od pacientů s pokročilými a na léčbu refrakterními testikulárními nádory objevit nové kandidátní geny vývoje TGCT a vzniku cisplatinové rezistence a případně poskytnout určitou validaci předchozím studiím, aby v budoucnu mohla být aplikovaná cílená biologická léčba pro pacienty s pokročilým TGCT.

Identifikovali jsme molekulární aberace v 9 kandidátních genech, jejichž charakter naznačuje, že se mohou podílet na vývoji TGCT a/nebo vzniku cisplatinové rezistence, a to *RBMX*, *TPTE2*, *PRAMEF8*, *TSPAN16*, *CDC27*, *PRDM9*, *DNAH12*, *ANKRD30A* a *HGC6.3*. Expres těchto genů je zpravidla typická pro varlata, 3 z nich jsou funkčně spojovány s neplodností, což je jedním ze signifikantních rizikových faktorů pro vznik TGCT. Naše výsledky nabízejí jak validaci několika předchozích studií molekulárních aberací TGCT, tak nové kandidátní geny, které představují zajímavé cíle pro další výzkum.

7. Seznam literatury

- Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bokemeyer, C., Cohn-Cedermark, G., Fizazi, K., Horwich, A., & Laguna, M. P. (2011). EAU Guidelines on Testicular Cancer: 2011 Update. *European Urology*, *60*(2), 304–319. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2011.05.038>
- Alikhani, M., Tabar, M. S., Mirshahvaladi, S., Kheimeh, A., Gilani, M. A. S., & Sabbaghian, M. (2013). Expression Analysis of RNA-Binding Motif Gene on Y Chromosome (RBM1) Protein Isoforms in Testis Tissue and a Testicular Germ Cell Cancer-Derived Cell Line (NT2). *Iranian Biomedical Journal*, *17*(2), 54. <https://doi.org/10.6091/IBJ.1148.2013>
- Armstrong, B., & Doll, R. (1975). Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *International Journal of Cancer*, *15*(4), 617–631. <https://doi.org/10.1002/IJC.2910150411>
- Atkin, N. B., & Baker, M. C. (1982). SPECIFIC CHROMOSOME CHANGE, i(12p), IN TESTICULAR TUMOURS? *The Lancet*, *320*(8311), 1349. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)91557-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)91557-4)
- Biermann, K., Göke, F., Nettersheim, D., Eckert, D., Zhou, H., Kahl, P., Gashaw, I., Schorle, H., & Büttner, R. (2007). c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. *The Journal of Pathology*, *213*(3), 311–318. <https://doi.org/10.1002/PATH.2225>
- Bray, F., Richiardi, L., Ekbom, A., Pukkala, E., Cuninkova, M., & Møller, H. (2006). Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. *International Journal of Cancer*, *118*(12), 3099–3111. <https://doi.org/10.1002/IJC.21747>
- Cassim, F., Pearlman, A., Matz, E., Terlecki, R., van der Merwe, A., Lazarus, J., Lloyd, C., & Kowlessur, B. (2021). Trends in testicular germ cell tumors among native black African men do not mirror those of African Americans: multi-institutional data from South Africa. *African Journal of Urology*, *27*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/S12301-021-00154-W/FIGURES/3>
- Coffey, J., Linger, R., Pugh, J., Dudakia, D., Sokal, M., Easton, D. F., Bishop, D. T., Stratton, M., Huddart, R., & Rapley, E. A. (2008). Somatic KIT mutations occur predominantly in seminoma germ cell tumors and are not predictive of bilateral disease: Report of 220 tumors and review of literature. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *47*(1), 34–42. <https://doi.org/10.1002/GCC.20503>
- Cook, M. B., Akre, O., Forman, D., Madigan, M. P., Richiardi, L., & McGlynn, K. A. (2009). A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer--experiences of the mother. *International Journal of Epidemiology*, *38*(6), 1532–1542. <https://doi.org/10.1093/IJE/DYP287>
- Coupland, C. A. C., Forman, D., Chilvers, C. E. D., Davey, G., Pike, M. C., & Oliver, R. T. D. (2004). Maternal Risk Factors for Testicular Cancer: A Population-Based Case–

- Control Study (UK). *Cancer Causes & Control* 2004 15:3, 15(3), 277–283.
<https://doi.org/10.1023/B:CACO.0000024257.49409.1F>
- Danjou, A. M. N., Pérol, O., Coste, A., Faure, E., Béranger, R., Boyle, H., Belladame, E., Grassot, L., Dubuis, M., Spinosi, J., Bouaoun, L., Fléchon, A., Bujan, L., Drouineaud, V., Eustache, F., Berthaut, I., Perrin, J., Brugnon, F., Charbotel, B., ... Fervers, B. (2021). Domestic use of pesticides during early periods of development and risk of testicular germ cell tumors in adulthood: a French nationwide case-control study. *Environ Health*, 20, 111. <https://doi.org/10.1186/s12940-021-00795-y>
- Datta, M. W., Macri, E., Signoretti, S., Renshaw, A. A., & Loda, M. (2001). Transition from in situ to invasive testicular germ cell neoplasia is associated with the loss of p21 and gain of mdm-2 expression. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 14(5), 437–442.
<https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.3880331>
- Delbridge, M. L., Lingenfelter, P. A., Disteche, C. M., & Marshall Graves, J. A. (1999). The candidate spermatogenesis gene RBMY has a homologue on the human X chromosome [1]. *Nature Genetics*, 22(3), 223–224. <https://doi.org/10.1038/10279>
- Dieckmann, K. P., Hartmann, J. T., Classen, J., Lüdde, R., Diederichs, M., & Pichlmeier, U. (2008). Tallness is associated with risk of testicular cancer: evidence for the nutrition hypothesis. *British Journal of Cancer* 2008 99:9, 99(9), 1517–1521.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604695>
- Dieckmann, K. P., & Pichlmeier, U. (2002). Is risk of testicular cancer related to body size? *European Urology*, 42(6), 564–569. [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(02\)00467-0](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(02)00467-0)
- Dieckmann, K. P., Radtke, A., Spiekermann, M., Balks, T., Matthies, C., Becker, P., Ruf, C., Oing, C., Oechsle, K., Bokemeyer, C., Hammel, J., Melchior, S., Wosniok, W., & Belge, G. (2017). Serum Levels of MicroRNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker for Germ Cell Tumours. *European Urology*, 71(2), 213–220.
<https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2016.07.029>
- Fang, F., Iaquina, P. J., Xia, N., Liu, L., Diao, L., & Reijo Pera, R. A. (2022). Transcriptional control of human gametogenesis. *Human Reproduction Update*, 28(3), 313.
<https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMAC002>
- Feichtinger, J., & McFarlane, R. J. (2019). Meiotic gene activation in somatic and germ cell tumours. *Andrology*, 7(4), 415. <https://doi.org/10.1111/ANDR.12628>
- Feldman, D. R., Iyer, G., van Alstine, L., Patil, S., Al-Ahmadie, H., Reuter, V. E., Bosl, G. J., Chaganti, R. S., & Solit, D. B. (2014). Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors. *Clinical Cancer Research*, 20(14), 3712–3720. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2868/86217/AM/PRESENCE-OF-SOMATIC-MUTATIONS-WITHIN-PIK3CA-AKT>
- Fénichel, P., & Chevalier, N. (2019). Is Testicular Germ Cell Cancer Estrogen Dependent? The Role of Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrinology*, 160(12), 2981–2989.
<https://doi.org/10.1210/EN.2019-00486>

- Gillis, A. J. M., Stoop, H., Biermann, K., van Gurp, R. J. H. L. M., Swartzman, E., Cribbes, S., Ferlinz, A., Shannon, M., Oosterhuis, J. W., & Looijenga, L. H. J. (2011). Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *International Journal of Andrology*, *34*(4 PART 2). <https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2011.01148.X>
- Gopalakrishnan, S., van Emburgh, B. O., & Robertson, K. D. (2008). DNA methylation in development and human disease. *Mutation Research*, *647*(1–2), 30. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2008.08.006>
- Gurney, J. K., Sarfati, D., & Stanley, J. (2015). Obscure etiology, unusual disparity: the epidemiology of testicular cancer in New Zealand. *Cancer Causes and Control*, *26*(4), 561–569. <https://doi.org/10.1007/S10552-015-0533-4/FIGURES/1>
- Honecker, F., Wermann, H., Mayer, F., Gillis, A. J. M., Stoop, H., van Gurp, R. J. L. M., Oechsle, K., Steyerberg, E., Hartmann, J. T., Dinjens, W. N. M., Oosterhuis, J. W., Bokemeyer, C., & Looijenga, L. H. J. (2009). Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(13), 2129–2136. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.8623>
- Houldsworth, J., Xiao, H., Murty, V. V. V. S., Chen, W., Ray, B., Reuter, V. E., Bosl, G. J., & Chaganti, R. S. K. (1998). Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene 1998 16:18*, *16*(18), 2345–2349. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201770>
- Kawakami, T., Okamoto, K., Ogawa, O., & Okada, Y. (2004). XIST unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer. *Lancet*, *363*(9402), 40–42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15170-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15170-7)
- Kemmer, K., Corless, C. L., Fletcher, J. A., McGreevey, L., Haley, A., Griffith, D., Cummings, O. W., Wait, C., Town, A., & Heinrich, M. C. (2004). KIT Mutations Are Common in Testicular Seminomas. *Am J Pathol*, *164*, 305–313.
- Koul, S., Mckiernan, J. M., Narayan, G., Houldsworth, J., Bacik, J., Dobrzynski, D. L., Assaad, A. M., Mansukhani, M., Reuter, V. E., Bosl, G. J., Chaganti, R. S., & Murty, V. V. (2004). *Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors*. <http://www.molecular-cancer.com/content/3/1/16>
- Kraggerud, S. M., Skotheim, R. I., Szymanska, J., Eknæs, M., Fosså, S. D., Stenwig, A. E., Peltomäki, P., & Lothe, R. A. (2002). Genome profiles of familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors. *Genes Chromosomes and Cancer*, *34*(2), 168–174. <https://doi.org/10.1002/GCC.10058>
- Lambrot, R., & Kimmins, S. (2011). Histone methylation is a critical regulator of the abnormal expression of POU5F1 and RASSF1A in testis cancer cell lines. *International Journal of Andrology*, *34*(2), 110–123. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2010.01063.X>
- Levine, H., Afek, A., Shamiss, A., Derazne, E., Tzur, D., Zavdy, O., Barchana, M., & Kark, J. D. (2013). Risk of germ cell testicular cancer according to origin: a migrant cohort study

- in 1,100,000 Israeli men. *International Journal of Cancer*, 132(8), 1878–1885.
<https://doi.org/10.1002/IJC.27825>
- Litchfield, K., Summersgill, B., Yost, S., Sultana, R., Labreche, K., Dudakia, D., Renwick, A., Seal, S., Al-Saadi, R., Broderick, P., Turner, N. C., Houlston, R. S., Huddart, R., Shipley, J., & Turnbull, C. (2015). Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nature Communications*, 6.
<https://doi.org/10.1038/NCOMMS6973>
- Looijenga, L. H. J., de Leeuw, H., van Oorschot, M., van Gorp, R. J. H. L. M., Stoop, H., Gillis, A. J. M., de Gouveia Brazao, C. A., Weber, R. F. A., Kirkels, W. J., van Dijk, T., von Lindern, M., Valk, P., Lajos, G., Olah, E., Nesland, J. M., Fosså, S. D., & Oosterhuis, J. W. (2003). Stem Cell Factor Receptor (c-KIT) Codon 816 Mutations Predict Development of Bilateral Testicular Germ-Cell Tumors. *CANCER RESEARCH*, 63, 7674–7678. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/22/7674/2509093/zch02203007674.pdf>
- Loveland, K. L., Dias, V., Meachem, S., & Rajpert-De Meyts, E. (2007a). The transforming growth factor- β superfamily in early spermatogenesis: Potential relevance to testicular dysgenesis. *International Journal of Andrology*, 30(4), 377–384.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2007.00769.X>
- Loveland, K. L., Dias, V., Meachem, S., & Rajpert-De Meyts, E. (2007b). KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. *International Journal of Andrology*, 30(4), 337–349.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2007.00769.X>
- Lutzker, S. G. (1998). P53 tumour suppressor gene and germ cell neoplasia. *APMIS*, 106(1), 85–89. <https://doi.org/10.1111/J.1699-0463.1998.TB01323.X>
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2013). Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLoS ONE*, 8(1).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0055387>
- Markt, S. C., Miller, R., O'Donnell, E., Albiges, L., Bernard, B. D., Lago-Hernandez, C., Curreri, S. A., Wright, A. A., Beard, C., & Sweeney, C. (2015). BMI at diagnosis and adverse outcomes among men with malignant testicular germ cell tumors. https://doi.org/10.1200/Jco.2015.33.7_suppl.400, 33(7_suppl), 400–400.
https://doi.org/10.1200/JCO.2015.33.7_SUPPL.400
- Masqué-Soler, N., Szczepanowski, M., Leuschner, I., Vokuhl, C., Haag, J., Calaminus, G., & Klapper, W. (2012). Absence of BRAF mutation in pediatric and adolescent germ cell tumors indicate biological differences to adult tumors. *Pediatric Blood & Cancer*, 59(4), 732–735. <https://doi.org/10.1002/PBC.24005>
- McGlynn, K. A., Zhang, Y., Sakoda, L. C., Rubertone, M. v., Erickson, R. L., & Graubard, B. I. (2006). Maternal Smoking and Testicular Germ Cell Tumors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15(10), 1820–1824. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0389>

- Milioli, H. H., Vimieiro, R., Riveros, C., Tishchenko, I., Berretta, R., & Moscato, P. (2015). The Discovery of Novel Biomarkers Improves Breast Cancer Intrinsic Subtype Prediction and Reconciles the Labels in the METABRIC Data Set. *PLoS ONE*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0129711>
- Minaguchi, T., Matsushima, M., Saito, S., Kanamori, Y., Shirahama, S., Okamoto, S., Minami, M., Taketani, Y., & Nakamura, Y. (1999). Complete DNA sequence and characterization of a 330-kb VNTR-rich region on chromosome 6q27 that is commonly deleted in ovarian cancer. *DNA Research*, *6*(2), 131–136. <https://doi.org/10.1093/DNARES/6.2.131>
- Møller, H., & Skakkebaek, N. E. (1999). Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ: British Medical Journal*, *318*(7183), 559. <https://doi.org/10.1136/BMJ.318.7183.559>
- Mueller, T., Mueller, L. P., Luetzkendorf, J., Voigt, W., Simon, H., & Schmoll, H. J. (2006). Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance. *Tumor Biology*, *27*(2), 71–83. <https://doi.org/10.1159/000092324>
- Nettersheim, D., Biermann, K., Gillis, A. J. M., Steger, K., Looijenga, L. H. J., & Schorle, H. (2011). NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. *Epigenetics*, *6*(1), 114. <https://doi.org/10.4161/EPI.6.1.13433>
- Netto, G. J., Nakai, Y., Nakayama, M., Jadallah, S., Toubaji, A., Nonomura, N., Albadine, R., Hicks, J. L., Epstein, J. I., Yegnasubramanian, S., Nelson, W. G., & de Marzo, A. M. (2008). Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *21*(11), 1337. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2008.127>
- Noel, E. E., Yeste-Velasco, M., Mao, X., Perry, J., Kudahetti, S. C., Li, N. F., Sharp, S., Chaplin, T., Xue, L., McIntyre, A., Shan, L., Powles, T., Oliver, R. T. D., Young, B. D., Shipley, J., Berney, D. M., Joel, S. P., & Lu, Y. J. (2010). The association of CCND1 overexpression and cisplatin resistance in testicular germ cell tumors and other cancers. *American Journal of Pathology*, *176*(6), 2607–2615. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2010.090780/ATTACHMENT/94496755-FA7B-4A48-86B2-FD4E6540FBE9/MMC3.DOC>
- Omolaoye, T. S., Omolaoye, V. A., Kandasamy, R. K., Hachim, M. Y., & du Plessis, S. S. (2022). Omics and Male Infertility: Highlighting the Application of Transcriptomic Data. *Life*, *12*(2), 280. <https://doi.org/10.3390/LIFE12020280>
- Ottesen, A. M., Skakkebaek, N. E., Lundsteen, C., Leffers, H., Larsen, J., & Rajpert-De Meyts, E. (2003). High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development. *Genes Chromosomes and Cancer*, *38*(2), 117–125. <https://doi.org/10.1002/GCC.10244>

- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., & Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, *19*(1), 5. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.167716>
- Pettersson, A., Kaijser, M., Richiardi, L., Askling, J., Ekblom, A., & Akre, O. (2004). Women smoking and testicular cancer: One epidemic causing another? *International Journal of Cancer*, *109*(6), 941–944. <https://doi.org/10.1002/IJC.20088>
- Rajpert-De Meyts, E., McGlynn, K. A., Okamoto, K., Jewett, M. A. S., & Bokemeyer, C. (2016). Testicular germ cell tumours. *The Lancet*, *387*(10029), 1762–1774. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00991-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00991-5)
- Reuter, V. E. (2005). Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology* *2005 18:2*, *18*(2), S51–S60. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800309>
- Richiardi, L., Bellocco, R., Adami, H.-O., Torráng, A., Barlow, L., Hakulinen, T., Rahu, M., Stengrevics, A., Storm, H., Tretli, S., Kurtinaitis, J., Tyczynski, J. E., & Akre, O. (2004). Testicular Cancer Incidence in Eight Northern European Countries: Secular and Recent Trends. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *13*(12), 2157–2166. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.2157.13.12>
- Sakurai, Y., Ichinoe, M., Yoshida, K., Nakazato, Y., Saito, S., Satoh, M., Nakada, N., Sanoyama, I., Umezawa, A., Numata, Y., Shi-Xu, J., Ichihara, M., Takahashi, M., & Murakumo, Y. (2020). Inactivation of REV7 enhances chemosensitivity and overcomes acquired chemoresistance in testicular germ cell tumors. *Cancer Letters*, *489*, 100–110. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.06.001>
- Selvi, I., Ozturk, E., Yikilmaz, T. N., Sarikaya, S., & Basar, H. (2020). Effects of testicular dysgenesis syndrome components on testicular germ cell tumor prognosis and oncological outcomes. *International Brazilian Journal of Urology : Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, *46*(5), 725. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2019.0387>
- Skakkebaek, N. E., Berthelsen, J. G., Giwercman, A., & Muller, J. (1987). Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *International Journal of Andrology*, *10*(1), 19–28. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.1987.TB00161.X>
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G. M., Toppari, J., Andersson, A. M., Eisenberg, M. L., Jensen, T. K., Jørgensen, N., Swan, S. H., Sapra, K. J., Ziebe, S., Priskorn, L., & Juul, A. (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiological Reviews*, *96*(1), 55. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00017.2015>
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., & Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human Reproduction*, *16*(5), 972–978. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/16.5.972>
- Skotheim, R. I., Abeler, V. M., Nesland, J. M., Fosså, S. D., Holm, R., Wagner, U., Flørenes, V. A., Aass, N., Kallioniemi, O. P., & Lothe, R. A. (2003). Candidate Genes for

- Testicular Cancer Evaluated by In Situ Protein Expression Analyses on Tissue Microarrays. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 5(5), 397. [https://doi.org/10.1016/S1476-5586\(03\)80042-8](https://doi.org/10.1016/S1476-5586(03)80042-8)
- Song, A., Myung, N. K., Bogumil, D., Ihenacho, U., Burg, M. L., & Cortessis, V. K. (2020). Incident testicular cancer in relation to using marijuana and smoking tobacco: A systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 38(7), 642.e1-642.e9. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2020.03.013>
- Syring, I., Bartels, J., Holdenrieder, S., Kristiansen, G., Müller, S. C., & Ellinger, J. (2015). Circulating Serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as Biomarkers in Patients with Testicular Germ Cell Cancer. *Journal of Urology*, 193(1), 331–337. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2014.07.010>
- Taylor-Weiner, A., Zack, T., O'Donnell, E., Guerriero, J. L., Bernard, B., Reddy, A., Han, G. C., Aldubayan, S., Amin-Mansour, A., Schumacher, S. E., Litchfield, K., Turnbull, C., Gabriel, S., Beroukhim, R., Getz, G., Carter, S. L., Hirsch, M. S., Letai, A., Sweeney, C., & van Allen, E. M. (2016). Genomic evolution and chemoresistance in germ-cell tumours. *Nature*, 540(7631), 114. <https://doi.org/10.1038/NATURE20596>
- Trabert, B., Chen, J., Devesa, S. S., Bray, F., & McGlynn, K. A. (2015). International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology*, 3(1), 4. <https://doi.org/10.1111/ANDR.293>
- Vliagoftis, H., Worobec, A. S., & Metcalfe, D. D. (1997). The protooncogene c-kit and c-kit ligand in human disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(4), 435–440. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70131-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70131-3)
- Wanderås, E. H., Grotmol, T., Fosså, S. D., & Tretli, S. (1998). Maternal health and pre- and perinatal characteristics in the etiology of testicular cancer: a prospective population- and register-based study on Norwegian males born between 1967 and 1995. *Cancer Causes & Control: CCC*, 9(5), 475–486. <https://doi.org/10.1023/A:1008857702380>
- Weir, H. K., Kreiger, N., & Marrett, L. D. (1998). Age at puberty and risk of testicular germ cell cancer (Ontario, Canada). *Cancer Causes & Control: CCC*, 9(3), 253–258. <https://doi.org/10.1023/A:1008864902104>
- Wermann H., Stoop H., Gillis A.J., Honecker F., van Gorp R.J., Ammerpohl O., Richter J., Oosterhuis J.W., Bokemeyer C., Looijenga L.H. (2010) Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: Association with differentiation and cisplatin resistance. *J. Pathol.* 2010;221:433–442. doi: 10.1002/path.2725.
- Wu, C., Ding, X., Li, H., Zhu, C., & Xiong, C. (2013). Genome-wide promoter methylation profile of human testis and epididymis: identified from cell-free seminal DNA. *BMC Genomics*, 14(1), 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-288>
- Xu, G. L., Bestor, T. H., Bourc'His, D., Hsieh, C. L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J. J., & Viegas-Péquignot, E. (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, 402(6758), 187–191. <https://doi.org/10.1038/46052>

Znaor, A., Skakkebak, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Laversanne, M., Kuliš, T., Gurney, J., Sarfati, D., McGlynn, K. A., & Bray, F. (2020). Testicular cancer incidence predictions in Europe 2010–2035: a rising burden despite population ageing. *International Journal of Cancer*, *147*(3), 820. <https://doi.org/10.1002/IJC.32810>