



**INSTYTUT CENTRUM ZDROWIA MATKI POLKI**

**w Łodzi**

lek. Tadeusz Kałużewski

**„Zastosowanie wybranych metod diagnostyki molekularnej w optymalizacji  
postępowania onkologicznego”**

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych

i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Agnieszka Gach, prof. instytutu

Pracę wykonano w Zakładzie Genetyki

Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Łódź, 2024 r.

*Składam serdeczne podziękowania*

*Pani Profesor Agnieszce Gach,  
za nieocenioną pomoc, zaangażowanie  
i nieustające wsparcie merytoryczne.*

*Wszystkim Współautorom,  
za wspólną pracę przy prowadzeniu badań, rady i wskazówki.*

*Mojemu tacie,  
za wzbudzenie pasji do nauki i genetyki człowieka.*

## Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów .....	5
2. Wykaz publikacji.....	7
2.1. Publikacja pierwsza.....	7
2.2. Publikacja druga.....	7
2.3. Publikacja trzecia .....	7
2.4. Punktacja cyklu publikacji .....	8
3. Streszczenie w języku polskim.....	9
4. Streszczenie w języku angielskim .....	10
5. Wstęp.....	11
5.1. Zastosowanie badań molekularnych w badaniach przesiewowych .....	12
5.2. Zastosowanie badań molekularnych w diagnostyce nowotworów złośliwych	14
5.3. Zastosowanie badań molekularnych w diagnostyce predyspozycji	
dziedzicznych.....	16
6. Omówienie publikacji pierwszej: „The Usefulness of Cell-Based and Liquid-Based Urine Tests in Clarifying the Diagnosis and Monitoring the Course of Urothelial Carcinoma. Identification of Novel, Potentially. Actionable, <i>RB1</i> and <i>ERBB2</i> Somatic Mutations” .....	18
6.1. Cele pracy.....	18
6.2. Metodyka.....	18
6.2.1. Materiał.....	18
6.2.2. Metody.....	19
6.2.2.1. Test Cytourofish(+). .....	19
6.2.2.2. Sekwencjonowanie całogenomowe .....	19
6.2.2.3. Test Bladder EpiCheck .....	20
6.3. Wyniki.....	20
7. Omówienie publikacji drugiej: „Mutacje promotora genu TERT jako markery molekularne stanów przednowotworowych raka pęcherza moczowego. Przegląd literatury oraz opis przypadku”.....	25
7.1. Cele pracy.....	25
7.2. Metodyka.....	25
7.3. Wyniki.....	25
8. Omówienie publikacji trzeciej: „Report on the Effect of the Implementation of an Early Detection and Prevention of Cancer Program on Families at High Hereditary Risk-Concentrating on Patients Undergoing Genetic Diagnostics and Counseling in Central Poland”.....	27
8.1. Cele pracy.....	27

8.2.	Metodyka.....	27
8.2.1.	Pacjenci.....	27
8.2.1.1.	Kryteria kwalifikacji do grupy najwyższego ryzyka .....	28
8.2.1.2.	Kryteria kwalifikacji do grupy wysokiego ryzyka .....	28
8.2.1.3.	Kryteria kwalifikacji do badania mutacji założycielskich <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CHEK2</i> i <i>PALB2</i> .....	28
8.2.1.4.	Kryteria kwalifikacji do badania NGS.....	29
8.2.2.	Metody.....	29
8.3.	Wyniki.....	30
9.	Wnioski z cyklu publikacji .....	32
10.	Podsumowanie .....	33
11.	Kopia publikacji pierwszej .....	36
12.	Kopia publikacji drugiej .....	54
13.	Kopia publikacji trzeciej .....	60
14.	Zgoda komisji bioetycznej .....	70
15.	Piśmiennictwo.....	71



## **1. Wykaz stosowanych skrótów**

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

cfDNA – wolne pozakomórkowe DNA (ang. cell-free DNA)

CK20 – cytokeratyna 20 (ang. cytokeratin 20)

CNV – warianty liczby kopii (ang. copy number variation)

CUP – nowotwór o nieznanym punkcie wyjścia (ang. carcinoma of an unknown primary origin)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)

EAU – Europejskie Towarzystwo Urologiczne (ang. European Association of Urology)

ER – receptor estrogenowy (ang. estrogen receptor)

FDA – Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)

FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. fluorescence *in situ* hybridization)

HER2 – ludzki receptor czynnika wzrostu naskórka 2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2)

HGUC – rak urotelialny wysokiego stopnia złośliwości (ang. high-grade urothelial carcinoma)

IARC – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. International Agency for Research on Cancer)

IGV – Zintegrowana Przeglądarka Genomowa (ang. Integrative Genomics Viewer)

LncRNA – długie niekodujące RNA (ang. long non-coding RNA)

LUTS – objawy z dolnego odcinka układu moczowego (ang. lower urinary tract symptoms)

MCED – wczesne wykrywanie wielu nowotworów (ang. multi-cancer early detection)

MIBC – naciekający mięśniówkę rak pęcherza moczowego (ang. muscle invasive bladder cancer)

MLPA – multipleksowa zależna od ligacji amplifikacja sond (ang. multiplex ligation-dependent probe amplification)

NGS – sekwencjonowanie następnej generacji (ang. next-generation sequencing)

NMIBC – nienaciekającego mięśniówki raka pęcherza moczowego (ang. non-muscle invasive bladder cancer)

OMIM – Internetowy Katalog Dziedziczenia Mendlowskiego u Człowieka (ang. Online Mendelian Inheritance in Man)

p53 – białko 53 (ang. protein 53)

PCA3 – antygen raka gruczołu krokowego 3 (ang. prostate cancer antigen 3)

PCNA – antygen jądrowy komórek proliferujących (ang. proliferating cell nuclear antigen)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

PR – receptor progesteronowy (ang. progesteron receptor)

PRUSC – Paryski System Raportowania Cytologii Moczu (ang. The Paris System for Reporting Urinary Cytology)

Rb1 – białko retinoblastoma 1 (ang. retinoblastoma 1 protein)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)

RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction)

SARS-CoV-2 – drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

SMA – rdzeniowy zanik mięśni (ang. spinal muscular atrophy)

SNV – warianty pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide variation)

SV – warianty strukturalne (ang. structural variant)

TERT – odwrotna transkryptaza telomerazy (ang. telomerase reverse transcriptase)

TRUS – ultrasonografia przezodbytnicza (ang. transrectal ultrasonography)

WGS – sekwencjonowanie całego genomu (ang. whole genome sequencing)

## **2. Wykaz publikacji**

Poniższy cykl publikacji, będący podstawą postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora, składa się z dwóch oryginalnych artykułów naukowych oraz jednego artykułu przeglądowego.

### **2.1. Publikacja pierwsza**

Kałużewski, T., Przybylski, G. K., Bednarek, M., Glazar, S., Grabiec, M., Jędrzejczyk, A., Kępczyński, Ł., Kubiak, I., Kucharska, D., Morel, A., Owczarek, M., Rożniecki, M., Sałamunia, J., Szewczyk, D., Szwałski, J., & Kałużewski, B. (2021). The Usefulness of Cell-Based and Liquid-Based Urine Tests in Clarifying the Diagnosis and Monitoring the Course of Urothelial Carcinoma. Identification of Novel, Potentially Actionable, RB1 and ERBB2 Somatic Mutations. *Journal of personalized medicine*, 11(5), 362. <https://doi.org/10.3390/jpm11050362>.

(IF = 3.508, MNiSW = 70)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za zaplanowanie i koncepcję pracy, udział w pozyskaniu środków na badanie, przeprowadzenie analizy bioinformatycznej, przygotowanie rycin oraz napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

### **2.2. Publikacja druga**

Kałużewski T, Kubiak I, Kępczyński Ł, Jędrzejczyk A, Rożniecki M, Gach A, Kałużewski B. Mutacje promotora genu *TERT* jako markery molekularne stanów przednowotworowych raka pęcherza moczowego. Przegląd literatury oraz opis przypadku. W W. Krupski (red.), *Medycyna spersonalizowana 2022 : monografia* (s. 33–38).

(MNiSW = 20)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za koncepcję pracy, przegląd literatury oraz napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Proporcjonalny udział w realizacji pracy – 80%.

### **2.3. Publikacja trzecia**

Kałużewski, T., Kubiak, I., Bednarek, M., Sałamunia, J., Kucharska, D., Kępczyński, Ł., Stempień, M., Kubicki, T., Trzciński, R., Gordon-Sönmez, Z., Bartosińska-Dyc, A.,

Gach, A., & Kałużewski, B. (2023). Report on the Effect of the Implementation of an Early Detection and Prevention of Cancer Program on Families at High Hereditary Risk-Concentrating on Patients Undergoing Genetic Diagnostics and Counseling in Central Poland. *International journal of molecular sciences*, 24(17), 13178. <https://doi.org/10.3390/ijms241713178>.

(IF = 4.9, MNiSW = 140)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za zaplanowanie i koncepcję pracy, zgromadzenie danych klinicznych, interpretację wyników oraz napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

#### **2.4. Punktacja cyklu publikacji**

Łączna punktacja MNiSW cyklu publikacji: 230.

Łączny Impact Factor cyklu publikacji: 8.408.

### 3. Streszczenie w języku polskim

Nowotwory złośliwe tkanki nabłonkowej stanowią istotny problem zdrowotny, wymagający wielodyscyplinarnego podejścia zarówno na etapie diagnostyki, jak i leczenia. Wraz z rozwojem wiedzy z zakresu genetyki nowotworów znacząco wzrosło znaczenie diagnostyki molekularnej w wykrywaniu, rozpoznawaniu, monitorowaniu oraz leczeniu tej grupy chorób. W prezentowanej rozprawie doktorskiej przedstawiono cykl publikacji omawiających zastosowanie wybranych metod diagnostyki genetycznej w optymalizacji postępowania onkologicznego, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki raka pęcherza moczowego oraz oceny dziedzicznych predyspozycji do nowotworów. W pierwszej pracy oceniono użyteczność sekwencjonowania całego genomu w odniesieniu do rutynowo stosowanych metod diagnostyki raka pęcherza moczowego. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna danych uzyskanych z sekwencjonowania próbek DNA izolowanych z moczu oraz krwi obwodowej umożliwiła m.in. identyfikację charakterystycznych zmian genetycznych dla raka pęcherza moczowego oraz potencjalnych markerów terapii celowanych. W drugiej pracy omówiono aktualny stan wiedzy na temat znaczenia wariantów w obrębie promotora genu *TERT* w wykrywaniu raka pęcherza moczowego z próbek moczu. Przeprowadzono także retrospektywną analizę danych pochodzących z pierwszej publikacji cyklu pod kątem obecności tych wariantów, zwracając uwagę na ich potencjalną użyteczność we wczesnej diagnostyce raka pęcherza moczowego. Trzecia publikacja opierała się na retrospektywnej analizie wyników badań molekularnych przeprowadzonych na grupie pacjentek i pacjentów z podejrzeniem zespołów dziedzicznych predyspozycji do nowotworów. Praca przedstawia częstość wykrywania poszczególnych wariantów w badanej populacji oraz omawia zalety sekwencjonowania następnej generacji w określonych sytuacjach klinicznych. Przedstawione w rozprawie zastosowanie badań genetycznych stanowi przykład skutecznego wykorzystania ich jako narzędzi diagnostycznych w onkologii, umożliwiających precyzyjne rozpoznawanie i molekularną klasyfikację nowotworów oraz identyfikację zespołów dziedzicznych predyspozycji.

#### **4. Streszczenie w języku angielskim**

Malignant epithelial tumors represent a significant health problem, requiring a multidisciplinary approach both in diagnostics and treatment. With the advancement of knowledge in the field of cancer genetics, the importance of molecular diagnostics in the detection, diagnosis, monitoring, and treatment of this group of diseases has significantly increased. This doctoral dissertation presents a series of publications covering the topic of the application of selected genetic diagnostic methods in the optimization of oncological management, with particular emphasis on bladder cancer diagnostics and the assessment of hereditary cancer predisposition syndromes. The first study evaluated the usefulness of whole-genome sequencing in relation to routinely used diagnostic methods for bladder cancer. The bioinformatic analysis of data obtained from sequencing DNA samples isolated from urine and peripheral blood allowed, among other things, the identification of characteristic genetic alterations specific to bladder cancer and potential markers for targeted therapies. The second study focused on the current state of knowledge on the significance of variants within the *TERT* gene promoter in detecting bladder cancer from urine samples. A retrospective analysis of data from the first publication of the series was also conducted, focusing on the presence of these variants and their potential utility in the early diagnosis of bladder cancer. The third publication was based on a retrospective analysis of molecular test results conducted on a group of patients suspected of having hereditary cancer predispositions. The study presents the frequency of detection of specific variants in the studied population and discusses the advantages of next-generation sequencing in certain clinical situations. The genetic research applications presented in this dissertation exemplify their effective use as diagnostic tools in oncology, enabling precise tumor identification and molecular classification, as well as the identification of hereditary cancer predisposition syndromes.

## 5. Wstęp

Nowotwory złośliwe, w tym raki, czyli nowotwory złośliwe wywodzące się z tkanki nabłonkowej, są jedną z głównych przyczyn zachorowalności i śmiertelności ludzi na całym świecie, a ich częstość występowania stale rośnie. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (ang. International Agency for Research on Cancer, IARC) nowotwory złośliwe tkanki nabłonkowej odpowiadają za około 10 milionów zgonów rocznie, co jednoznacznie wskazuje na istotność raków jako globalnego problemu zdrowia publicznego[1]. W Europie rak stanowi drugą, po chorobach układu krążenia przyczynę zgonów, chociaż w niektórych krajach, w tym w Polsce, w 2021 roku stanowił trzecią przyczynę po infekcjach wirusem SARS-CoV-2[2]. Polska należy do tych krajów europejskich, w których odsetek śmiertelności z powodu nowotworów jest najwyższy[3,4].

Nowotwory to choroby genetyczne powstające w wyniku nagromadzenia mutacji w genach kontrolujących podziały komórkowe oraz biorących udział w kluczowych procesach biologicznych[5]. Wraz z rozwojem wiedzy z zakresu biologii nowotworów rośnie zrozumienie udziału czynników genetycznych warunkujących tempo ich rozwoju oraz charakterystykę[6]. Rola genetyki w onkologii zaczęła się kształtować wraz z odkryciem dziedzicznych zespołów predyspozycji do nowotworów, takich jak zespół dziedzicznego raka piersi i jajnika[7] czy rodzinna polipowatość gruczolakowata[8]. Z czasem objęła znacznie szersze spektrum mutacji genetycznych – zarówno germinalnych, jak i somatycznych[6]. Włączenie testów genetycznych do opieki onkologicznej zmieniło podejście z uniwersalnego na zindywidualizowaną, precyzyjną strategię. Uwzględnienie profilu molekularnego guza wpływa bowiem na klasyfikację, wybór terapii, prognozowanie, a także, pośrednio, na identyfikację osób z grupy wysokiego, dziedzicznie uwarunkowanego ryzyka[9]. Przed wzrostem popularności diagnostyki genetycznej klasyfikacja guzów nowotworowych opierała się głównie na typie komórek, tkance pochodzenia oraz cechach morfologicznych obserwowanych z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego[10]. Dopiero postęp w zrozumieniu molekularnej patofizjologii nowotworów, umożliwił wprowadzenie systemów klasyfikacji, które łączą dane molekularne z obrazem histopatologicznym oraz informacjami klinicznymi, pozwalając precyzyjniej określić charakterystykę guza oraz przewidzieć ryzyko nawrotu choroby lub zgonu pacjenta[11]. Z uwagi na fakt, że odpowiedź na terapię cytotoksyczne[12], immunologiczne[13] i celowane[14–16] często

zależy od molekularnego podtypu nowotworu, diagnostyka molekularna stała się również nieodzownym elementem w doborze najefektywniejszego leczenia. Początkowo większość testów diagnostycznych wykrywała jedynie pojedyncze warianty, takie jak *BRAF* p.Val600Glu (V600E), oznaczane w celu kwalifikacji do leczenia celowanego czerniaka[14], jednak bardzo szybki wzrost liczby znanych genów o znaczeniu terapeutycznym uwypuklił ograniczenia diagnostyki z użyciem pojedynczych markerów[17]. Zarówno wzrost liczby klinicznie walidowanych zmian genetycznych, jak i ograniczona dostępność materiału nowotworowego u wielu pacjentów, wymagały opracowania testów opartych na technikach wysokoprzepustowych, które mogły ocenić status mutacyjny kilku genów w jednym badaniu. Rozwój technologii sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next-Generation Sequencing, NGS) umożliwił jednoczesną analizę setek genów, a nawet całego genomu, przy użyciu relatywnie niewielkiej ilości materiału biologicznego[18–27], co zrewolucjonizowało podejście do diagnostyki molekularnej oraz otworzyło drogę do precyzyjnej onkologii[28–30]. Jednym z efektów wykorzystywania techniki NGS jest coraz częstsze stosowanie strategii tumor-agnostycznej, polegającej na sekwencjonowaniu bardzo dużej ilości genów związanych z różnymi typami nowotworów w jednym eksperymencie[31]. Metody ukierunkowane na pojedyncze warianty, takie jak testy oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR) czy fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) nadal znajdują zastosowanie w określonych sytuacjach klinicznych, w których czas i efektywność ekonomiczna przy zachowaniu wysokiej czułości i swoistości są istotniejsze od szerokiego zakresu badania[32].

W prezentowanej rozprawie skupiono się na zastosowaniu badań molekularnych w diagnostyce nowotworów złośliwych tkanki nabłonkowej na różnych etapach opieki nad pacjentami onkologicznymi: od badań przesiewowych, poprzez szerokie profilowanie genomowe, do diagnostyki zespołów dziedzicznych predyspozycji do nowotworów.

### **5.1. Zastosowanie badań molekularnych w badaniach przesiewowych**

Badania przesiewowe przeprowadzane są u osób bezobjawowych w celu wykrycia i wczesnego leczenia danej choroby. Aby test przesiewowy mógł zostać wdrożony do praktyki klinicznej musi charakteryzować się odpowiednią czułością, swoistością i przystępnością dla pacjentów przy jednoczesnym istnieniu dowodów, że wykrycie



choroby w fazie przedobjawowej i wczesne wdrożenie leczenia znacząco poprawi wyniki terapii[33].

Testy molekularne odgrywają coraz większą rolę w diagnostyce przesiewowej. Wiodącym przykładem są testy PCR wykrywające homozygotyczną delecję eksonu 7 genu *SMN1* w diagnostyce przesiewowej rdzeniowego zaniku mięśni (ang. spinal muscular atrophy, SMA). Screening w kierunku SMA realizowany jest w coraz większej liczbie krajów, w tym w Polsce od kwietnia 2022 roku[34]. Dotychczas żadne testy molekularne ukierunkowane na wykrywanie nowotworów nie uzyskały statusu badań przesiewowych wykorzystywanych na poziomie krajowym, jednakże stale rosnący potencjał diagnostyki molekularnej wskazuje na możliwość wprowadzenia takich testów w przyszłości, co może znacząco poprawić skuteczność profilaktyki onkologicznej[35]. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. U.S. Food and Drug Administration, FDA) zatwierdziła do tej pory trzy testy służące diagnostyce przesiewowej raka jelita grubego (Epi ProColon®, Cologuard, Shield™) oraz jeden molekularny test screeningowy w kierunku raka prostaty (Progenesa™ PCA3). Test Epi ProColon® polega na badaniu obecności metylowanego genu *SEPT9* w próbce wolnokrążącego DNA izolowanego z krwi obwodowej. Test charakteryzuje się 68% czułością oraz 80% swoistością[36]. Cologuard wykrywa warianty genu *KRAS*, metylację genów *NDRG3* i *BMP3* oraz obecności hemoglobiny (metodą immunologiczną) w próbce stolca. Badanie wykazuje 92.3% czułość oraz 86.6% swoistość[37]. Shield™ jest testem opartym na ocenie metylacji wolnokrążącego DNA (cfDNA) i cechuje się 83.1% czułością oraz 89.6% swoistością[38]. Progenesa™ PCA3 charakteryzuje się czułością na poziomie 78% oraz swoistością na poziomie 57% w grupie pacjentów z podejrzeniem raka prostaty, po jednej negatywnej biopsji w przeszłości[39]. Badanie polega na wykrywaniu nadekspresji genu *PCA3* - długiego niekodującego RNA (lncRNA). Obiecującymi molekularnymi testami przesiewowymi w kierunku raka prostaty są również SelectMDX, Mi Prostate score (MiPS) oraz ExoDX jednak ich status określany jest jako eksperymentalny[40]. Wytyczne Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (ang. European Association of Urology, EAU) wskazują na przydatność licznych markerów molekularnych jako wsparcia w diagnostyce oraz monitorowaniu nienaciekających raków pęcherza moczowego m.in. UroVysion, Uromonitor, Cx-Bladder, Xpert Bladder® oraz Bladder EpiCheck™. Wykorzystanie ich w diagnostyce przesiewowej jest jednak nierekomendowane ze względu na krótką fazę bezobjawową oraz niską efektywność

kosztową (<https://uroweb.org/guidelines/non-muscle-invasive-bladder-cancer>; dostęp z dnia 19.08.2024). Obiecującym testem w urologii jest również badanie obecności microRNA miR-371a-3p w diagnostyce raków jądra wykazujące 84-89% czułość oraz 90-99% swoistość[41], które po uzyskaniu standaryzacji laboratoryjnej mogłoby zostać wdrożone do praktyki klinicznej[42,43]. Rozwój metod wysokoprzepustowych budzi nadzieje na jednoczasowy screening w kierunku wielu nowotworów (ang. multi-cancer early detection, MCED)[44]. Większość platform opiera się na wykrywaniu specyficznych białek, RNA lub wolnokrążącego DNA nowotworowego (w tym jego zaburzeń epigenetycznych), które są uwalniane do krwi lub moczu m.in. poprzez apoptozę komórek nowotworowych[45–47]. Wiele rozwiązań znajduje się w fazach przedklinicznych lub klinicznych, i są aktualnie optymalizowane przed wdrożeniem do praktyki[35,48,49].

Do cyklu prac uwzględnionych w rozprawie dołączono publikację przeglądową na temat wariantów w obrębie promotora genu *TERT* stanowiących obiecujący marker raków pęcherza moczowego. Opisane rozwiązania charakteryzuje się znacznie wcześniejszą wykrywalnością w komórkach osadu moczu niż aktualnie wykorzystywane wskaźniki.

## **5.2. Zastosowanie badań molekularnych w diagnostyce nowotworów złośliwych**

Diagnoza nowotworu zazwyczaj obejmuje wieloetapowy proces, który integruje ocenę kliniczną, badania obrazowe, badania laboratoryjne oraz ocenę histopatologiczną tkanki pobranej drogą biopsji lub materiału pooperacyjnego[50]. Jednakże w około 3-5% przypadków nowotworów przerzutowych nie udaje się zidentyfikować pierwotnego ogniska nowotworu i konieczne jest rozpoznanie nowotworu o nieznanym punkcie wyjścia (ang. carcinoma of an unknown primary origin, CUP). Rozpoznanie to znacząco utrudnia dobór odpowiedniej terapii i zmniejsza szansę na skuteczne leczenie pacjenta[51]. Wprowadzenie molekularnej diagnostyki wysokoprzepustowej pozwoliło na identyfikację charakterystycznych zmian genetycznych dla konkretnych typów histopatologicznych nowotworów[52], co stanowi dodatkowe wsparcie w postawieniu precyzyjnego rozpoznania. W jednym z badań pilotażowych profilowanie genomowe udowodniło swoją skuteczność w określaniu lokalizacji pierwotnej raków o nieznanym punkcie wyjścia oraz umożliwiło wdrożenie odpowiedniej terapii w 87,5% przypadków[53]. Opisywane są również stosunkowo liczne przypadki rewizji wcześniej

postawionego rozpoznania histopatologicznego, w wyniku których wprowadzono zmiany w postępowaniu leczniczym[19,54,55].

Niezwykle istotny przy określaniu rokowania oraz przyjmowaniu strategii leczenia jest podział nowotworów na podtypy o wspólnych cechach charakterystycznych. Historycznie podział ten odbywał się na podstawie cech histopatologicznych oraz immunohistochemicznych w odniesieniu do epidemiologii i objawów klinicznych. Znaczący postęp w tej dziedzinie wprowadziła diagnostyka genetyczna materiału tkankowego, pozwalająca na zdefiniowanie nowych podtypów lepiej korelujących z częstością występowania, wiekiem zachorowania, środowiskowymi czynnikami ryzyka, przewidywanym przeżyciem oraz odpowiedzią na leczenie. Pierwszą molekularną klasyfikacją, która zyskała uznanie oraz ugruntowaną pozycję w praktyce klinicznej jest podział raków piersi na podtypy: luminalny, potrójnie ujemny, HER2-pozytywny i inne rzadsze podtypy. Tradycyjne biomarkery immunohistochemiczne (ER, PR, HER2, wskaźnik proliferacyjny Ki67) oraz cechy histopatologiczne zostały dopasowane do typów molekularnych i służą jako wskaźniki pośrednie w diagnostyce rutynowej[56–59]. Rosnące znaczenie w ostatnich latach ma również podział raków endometrium na podtypy: z licznymi wariantami genu *POLE*, niestabilnością mikrosatelitarną, niewielką ilością zmian liczby kopii (ang. Copy Number Variation, CNV) oraz z podwyższoną liczbą zmian typu CNV i wariantami genu *TP53*[60]. Molekularne klasyfikacje dla innych nowotworów złośliwych m.in. raka prostaty[61], jelita grubego[62], pęcherza[63,64], żołądka[65] czy niedrobnokomórkowego raka płuca[66] również zostały opracowane i aktualnie znajdują się na etapie walidacji klinicznej. Towarzystwa naukowe w aktualizacjach wytycznych postępowania poświęcają coraz więcej uwagi czynnikom genetycznym, podkreślając ich stale rosnącą rolę w diagnostyce nowotworów.

W prezentowanej rozprawie przedstawiono pracę oceniającą sekwencjonowanie całogenomowe komórek osadu moczu pacjenta z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego *in situ* jako narzędzia wspierającego proces precyzyjnej diagnostyki i klasyfikacji nowotworów układu moczowego.

### **5.3. Zastosowanie badań molekularnych w diagnostyce predyspozycji dziedzicznych**

Pierwszym zidentyfikowanym genem powiązany z wrodzoną predyspozycją do nowotworów, był opisany blisko 40 lat temu gen supresorowy *RBI*[67]. Od tamtego czasu identyfikacja pacjentów z wywiadem rodzinnym obciążonym występowaniem nowotworów w charakterystycznych, powtarzających się spektrach prowadziła do odkrywania kolejnych genów związanych z predyspozycjami dziedzicznymi[68]. Tradycyjnie diagnostyka zespołów rodzinnej predyspozycji do nowotworów składa się z szczegółowego wywiadu osobowego oraz rodzinnego pozwalającego wysunąć konkretne podejrzenie kliniczne oraz potwierdzenia podłoża molekularnego badaniem obecności wariantów patogennych w wybranych genach. Celem prowadzenia diagnostyki germinalnej jest identyfikacja pacjentów mogących skorzystać z dostosowanych programów badań przesiewowych, działań zmniejszających ryzyko zachorowania oraz kaskadowych testów genetycznych określających status nosicielstwa wariantów u krewnych[69,70]. Znaczącym przełomem w diagnostyce predyspozycji rodzinnych była identyfikacja częstych wariantów założycielskich m.in. w populacji żydów aszkenazyjskich[71] oraz polskiej[72–74]. Wprowadzenie prostych testów opartych na technice PCR znacząco przyczyniło się do znacznej popularyzacji badań genetycznych w kierunku nowotworów dziedzicznych[75].

Schemat postępowania uwzględniający wysunięcie klinicznego podejrzenia zespołu dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, a następnie jego weryfikacja genetyczna, był normą w poradniach zajmujących się rodzinnymi przypadkami nowotworów aż do spopularyzowania sekwencjonowania następnej generacji[76]. Wprowadzenie techniki NGS spowodowało coraz częstsze konsolidowanie procesu diagnostyki somatycznej i germinalnej[77]. Nowe podejścia do diagnostyki genetycznej nowotworów obejmują dwie główne możliwości: sekwencjonowanie tkanki nowotworu z uwzględnieniem genów związanych typowo z predyspozycjami dziedzicznymi wraz z ich następczą weryfikacją germinalną oraz jednoczesowe sekwencjonowanie materiału z guza i zdrowej tkanki (najczęściej krwi obwodowej). Warto zauważyć, że sekwencjonowanie germinalne ma miejsce w obu modelach postępowania, jednak w pierwszym podejściu ma charakter pośredni[78]. Częstość potwierdzania obecności mutacji w linii zarodkowej po uprzednim jej wykryciu w materiale nowotworowym jest różna dla różnych genów. Przykładowo w badaniu na ponad 2000 pacjentów wykazano, że 39% patogennych

wariantów w genach *BRCA1* i *BRCA2* oraz 28% w genach *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* zostało zidentyfikowanych jako pochodzące z linii germinalnej (po wcześniejszym wykryciu w tkance guza). Dla porównania, tylko 4% patogennych wariantów *TP53* miało pochodzenie germinalne, chociaż większość (64%) nosicieli nie spełniała kryteriów Chompret kwalifikujących do testowania germinalnych wariantów genu *TP53*. Z drugiej strony, ponad 8% wrodzonych zmian patogennych może być pominięte w sekwencjonowaniu materiału z guza ze względu na ograniczenia techniczne oraz różnice w podejściu do interpretacji wariantów w badaniach somatycznych i germinalnych[79]. W związku z powyższym wydaje się, że przyszłością w diagnostyce predyspozycji do nowotworów będzie równoległe badanie materiału nowotworowego oraz zdrowej tkanki, z następczą diagnostyką kaskadową członków rodziny w przypadku stwierdzenia wariantów germinalnych[77,80,81]. Wyraźne jest również stopniowe odejście od stosowania kryteriów klinicznych. Wykazano, że około połowa nosicieli wariantów patogennych w genach *BRCA1* i *BRCA2* nie spełnia wymagań rodowodowo-klinicznych do testów genetycznych[82]. W chwili obecnej diagnostyka predyspozycji dziedzicznych jest zalecana u wszystkich osób z rakami jajnika, trzustki, prostaty (w stopniu zaawansowanym) oraz przerzutowego raka piersi bez względu na wywiad rodzinny[83,84]. Ponadto zalecana jest ocena markerów zespołu Lyncha u wszystkich osób z rakiem jelita grubego i/lub endometrium[85].

Prezentowany cykl prac uwzględnia publikację podsumowującą diagnostykę predyspozycji rodzinnych do raków piersi, jajnika, jelita grubego oraz endometrium na grupie ponad 1000 osób z wykorzystaniem testów przesiewowych, szerokich paneli genów oraz celowanej oceny pod kątem delekcji/duplikacji wraz z odniesieniem do kryteriów klinicznych kwalifikujących do badań genetycznych.

## **6. Omówienie publikacji pierwszej: „The Usefulness of Cell-Based and Liquid-Based Urine Tests in Clarifying the Diagnosis and Monitoring the Course of Urothelial Carcinoma. Identification of Novel, Potentially. Actionable, *RB1* and *ERBB2* Somatic Mutations”**

### **6.1. Cele pracy**

Artykuł przedstawia zastosowanie technik molekularnych w diagnostyce i monitorowaniu raka pęcherza moczowego *in situ*. Praca koncentruje się na ocenie wiarygodności oraz przydatności sekwencjonowania całogenomowego (ang. whole genome sequencing, WGS) jako narzędzia diagnostycznego w porównaniu ze złotym standardem diagnostyki nieinwazyjnej nowotworów pęcherza moczowego: cytologią osadu moczu[86]. Dodatkowo praca uwzględnia zestawienie wyników WGS z immunocytochemiczną oceną ekspresji białka p53 oraz fluorescencyjną hybrydyzacją *in situ* (FISH).

W pracy omówiono również wyniki testu metylacji biomarkerów DNA (Bladder EpiCheck) w porównaniu z wynikami kontrolnych biopsji ściany pęcherza moczowego w monitorowaniu pacjenta po leczeniu dopęcherzową immunoterapią z zastosowaniem szczepionki BCG (Bacillus Calmette-Guérin).

W pracy wytypowano następujące cele badawcze:

1. Ocena przydatności sekwencjonowania genomu komórek osadu moczu metodą sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce raka pęcherza moczowego.
2. Opracowanie procedury określania charakteru somatycznego lub germinального wykrytych wariantów z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych.
3. Ocena wiarygodności testu metylacji Bladder EpiCheck w monitorowaniu raka pęcherza moczowego.

### **6.2. Metodyka**

#### **6.2.1. Material**

Materiałem wykorzystanym w badaniu były komórki osadu moczu oraz próbki krwi obwodowej pochodzące od 61-letniego mężczyzny, u którego ostatecznie rozpoznano raka pęcherza moczowego *in situ*. Pacjent pracujący od 48 lat w przemyśle metalurgicznym i palacz tytoniu (10 paczko-lat), zgłosił lekarzowi ogólnemu objawy ze strony dolnych dróg moczowych (ang. lower urinary tract symptoms, LUTS), w tym trudności w oddawaniu moczu, słaby strumień moczu i nawracające objawy zapalenia

pęcherza moczowego. Po nieskutecznym pierwotnym leczeniu furazydyną, pacjent został skierowany do urologa, który rozpoczął terapię tamsulozyną po uprzednim rozpoznaniu rozrostu gruczołu krokowego. Ze względu na brak poprawy do schematu leczenia dołączono finasteryd, a w dalszej kolejności antybiotykoterapię empiryczną. Leczenie trwało od 2013 do 2018 roku z miernym efektem klinicznym - pacjent zaczął cierpieć na stopniowo rozwijającą się nykturię. W 2018 r. ultrasonografia transrektalna (TRUS) ujawniła egzofityczną dyskretną zmianę w trójkącie pęcherza moczowego, która stanowiła wskazanie do poszerzenia diagnostyki w kierunku nowotworów pęcherza. Badania opisywane w pracy były wykonywane równolegle ze standardowym postępowaniem diagnostycznym i w rezultacie pozwoliły na postawienie rozpoznania raka pęcherza moczowego *in situ*.

### **6.2.2. Metody**

#### **6.2.2.1. Test Cytourofish(+)**

Cytourofish<sup>(+)</sup> to kompleksowy test, który składa się z cytologii osadu moczu oraz procedury fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), wykorzystującej trójkolorową sondę molekularną specyficzną dla regionu chromosomalnego 9p21 oraz centromerów chromosomów 9 i 17. W zależności od początkowych wyników testu, przeprowadzane są reakcje ekspresji immunocytochemicznej z wybranymi antygenami, takimi jak: p53, Ki67, CK20 lub PCNA. Próbkę do badania cytologicznego uzyskano przy użyciu zestawu „CYTOSET” (MPW MED. INSTRUMENTS, Warszawa, Polska). Wykonano rutynową procedurę barwienia metodą Papanicolaou bez modyfikacji. Cytologia osadu moczu była oceniana zgodnie z systematyką PRUSC (The Paris System for Reporting Urinary Cytology)[87]. Badanie techniką FISH przeprowadzono zgodnie z wewnętrzną procedurą laboratoryjną (załącznik A do publikacji), w której punkty odcięcia obejmowały utratę sygnału z regionu 9p21 w więcej niż 5 na 100 jąder komórkowych oraz polisomię chromosomu 9 i 17 w sumie w minimum 5 na 100 jąder komórkowych. Wykorzystano dedykowane sondy typu „custom made” (PanPath, Budel, Holandia). W przedstawionym przypadku oceniano wyłącznie ekspresję białka p53 zgodnie z wewnętrzną procedurą laboratoryjną (załącznik B do publikacji), a wyniki barwienia wyrażono jako procent z wartością graniczną ustaloną na poziomie 50%.

#### **6.2.2.2. Sekwencjonowanie całogenomowe**

DNA zostało wyizolowane z komórek osadu moczu i próbek krwi obwodowej. Izolację DNA przeprowadzono przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Sherlock

AX (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), zgodnie z instrukcją producenta. Czystość i stężenie wyizolowanych próbek DNA oceniono za pomocą spektrofotometru Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Hamburg, Niemcy). Stężenie DNA wynosiło 426,9 µg/mL dla próbek krwi oraz 76,9 µg/mL dla próbek moczu. Sekwencjonowanie całego genomu obu typów próbek przeprowadzono w Beijing Genome Institute (BGI, Hongkong) przy użyciu technologii sekwencjonowania następnej generacji.

Analiza wyników WGS została przeprowadzona za pomocą narzędzi bioinformatycznych oraz ręcznej oceny w przeglądarce Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.7.2 (Broad Institute, University of California)[88]. Identyfikację pojedynczych zmian nukleotydowych, krótkich insercji i delecji oraz rozróżnienie pochodzenia germinalnego/somatycznego wariantów przeprowadzono za pomocą programu VarScan v2.4.4[89] po konwersji danych do formatu mpileup przy użyciu oprogramowania SAMtools v1.10[90]. Identyfikację wariantów strukturalnych (SV) przeprowadzono za pomocą narzędzia Delly[91] w przypadku translokacji oraz funkcji bamCompare narzędzia deepTools v2.0[92] w przypadku delecji i amplifikacji. Graficzną prezentację uzyskanych danych przygotowano w języku programowania Perl za pomocą oprogramowania Circos v.0.69.9[93].

#### 6.2.2.3. Test Bladder EpiCheck

Test Bladder EpiCheck (Nucleix; Rehovot, Izrael) opiera się na analizie panelu 15 biomarkerów DNA, związanych z rakiem pęcherza moczowego i jest dedykowany do nieinwazyjnego monitorowania nawrotów nowotworów złośliwych. Umożliwia on określenie wartości EpiScore, która jest miarą ogólnego poziomu metylacji panelu biomarkerów, w zakresie od 0 do 100. Próg testu wynosi 60, co oznacza, że wszystkie wyniki równe lub wyższe od 60 są uznawane za pozytywne, natomiast wyniki poniżej 60 są uznawane za negatywne. Test Bladder EpiCheck został przeprowadzony na aparacie Rotor Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy), zgodnie z instrukcją obsługi zestawu, bez modyfikacji.

### 6.3. Wyniki

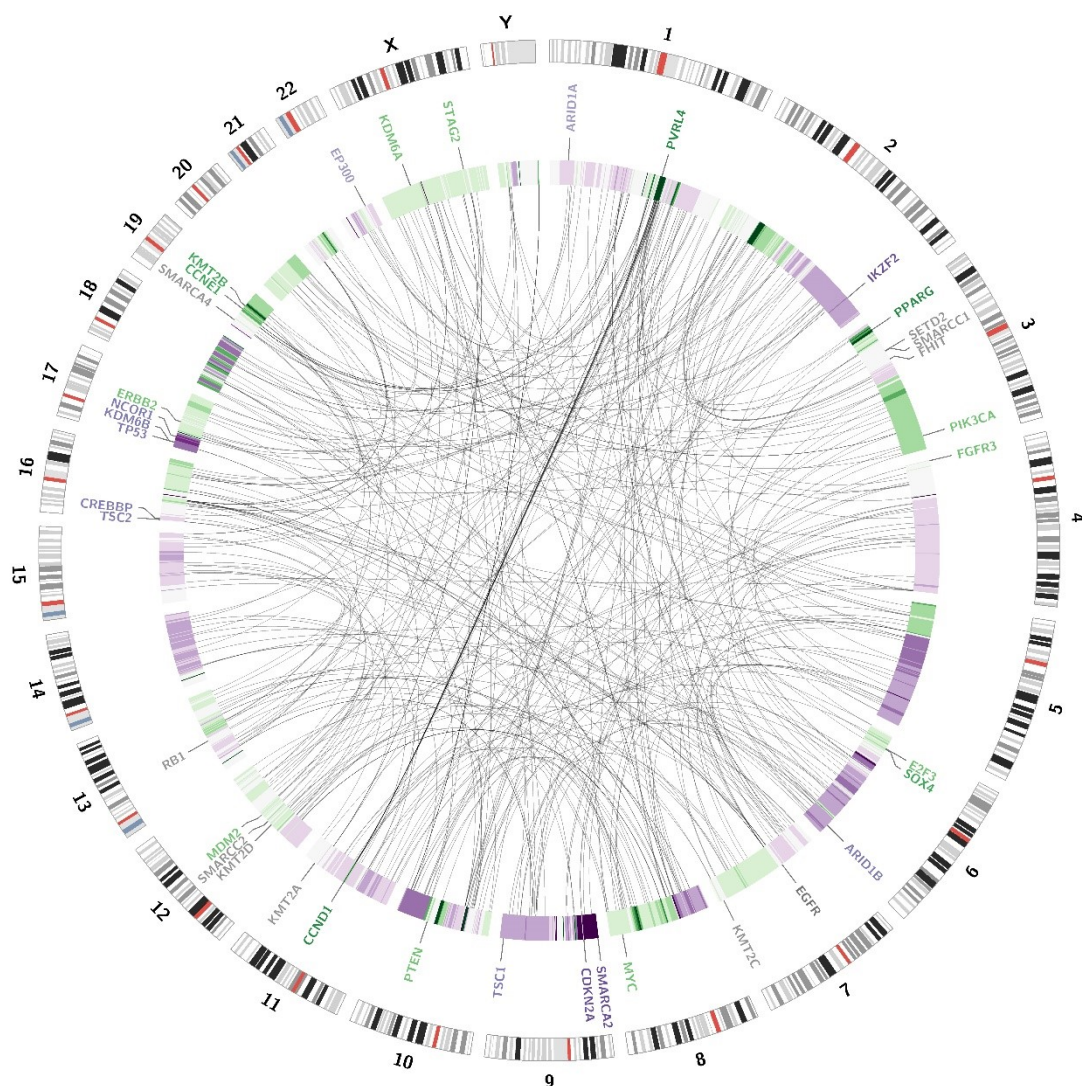
Ocena cytologiczna umożliwiła identyfikację raka urotelialnego wysokiego stopnia zaawansowania (ang. high-grade urothelial carcinoma, HGUC) na podstawie systematyki PRUSC. W ramach procedury FISH stwierdzono homozygotyczną (24% badanych komórek) i heterozygotyczną (60% badanych komórek) delecję w locus 9p21. Nie



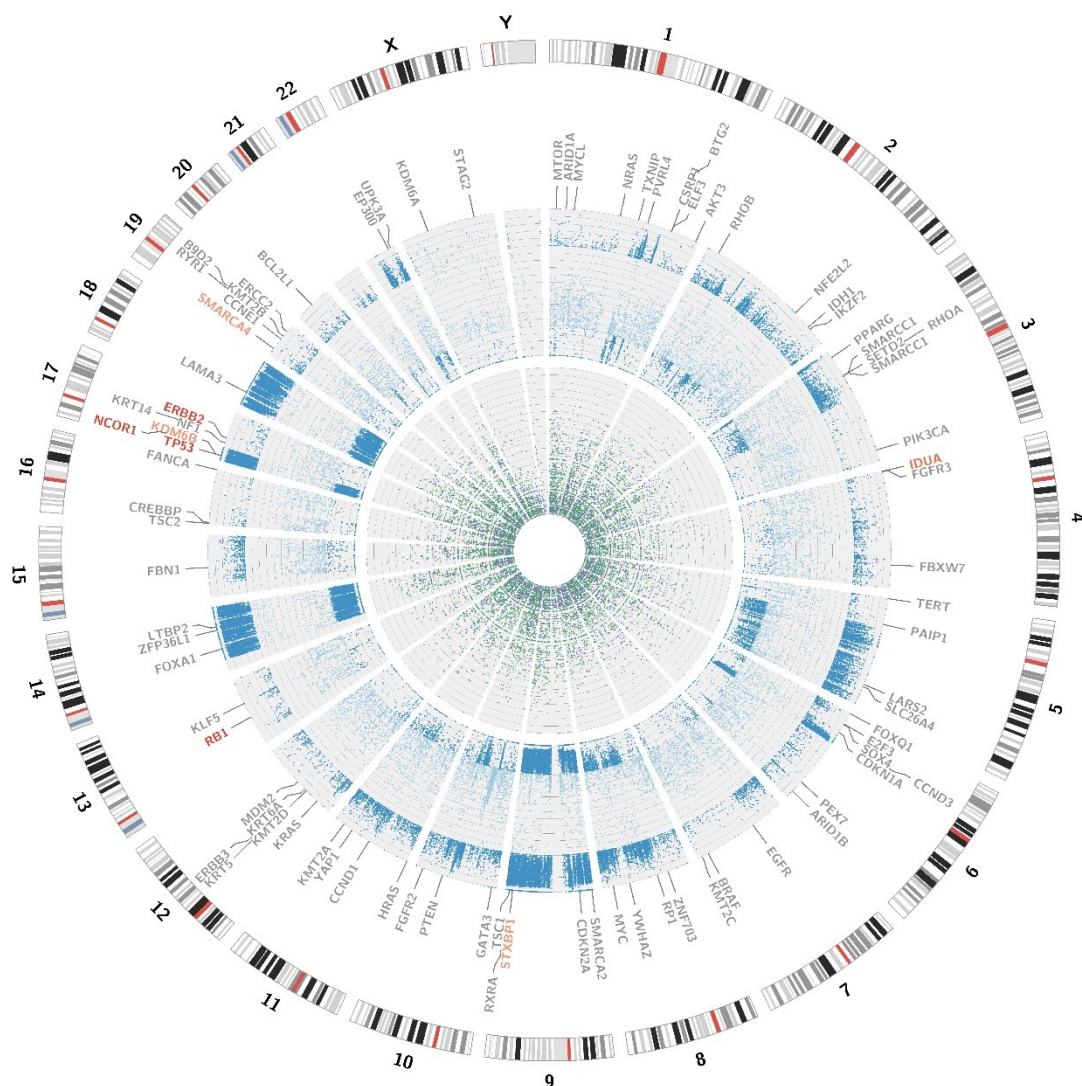
wykryto aberracji liczbowych za pomocą sond specyficznych dla centromerów chromosomów 9 i 17. W badaniu immunocytochemicznym wykazano nadekspresję białka p53 w 62% badanych komórek (z reakcją jądrową w 40% i cytoplazmatyczną w 22%). W ujęciu klinicznym powyższe wyniki stanowiły podstawę do skierowania pacjenta na zabieg cystoskopii, pobranie wycinków wraz z ich oceną histopatologiczną, a następnie postawienie rozpoznania raka pęcherza moczowego *in situ*. Z punktu widzenia celów badawczych pracy stanowiły one punkt odniesienia dla przeprowadzonego badania całogenomowego.

Zgodnie z oczekiwaniami wynikającymi z charakteru badanego materiału sekwencjonowanie całogenomowe wykazało obecność licznych zmian typu SNV (ang. single nucleotide variations), małych insercji i delecji oraz zaburzeń strukturalnych. Wizualizację wykrytych wariantów przedstawiono na rycinach 1 i 2. Wykryte zmiany, po odfiltrowaniu wariantów germinalnych, odpowiadały najczęściej spotykanym zaburzeniom genetycznym w rakach pęcherza moczowego. Analiza pokrycia potwierdziła obecność delecji 9p21 wykrytej w badaniu FISH oraz pozwoliła na potwierdzenie, że była to jedna z najczęstszych zmian strukturalnych w badanej populacji komórek, co odpowiada doniesieniom literaturowym na temat zaburzeń w obrębie chromosomu 9 w przypadkach raka pęcherza moczowego[94–99]. Ponadto analiza sekwencji wykazała obecność wariantu c.524G>T p.(Arg175Leu) genu *TP53*, który z dużym prawdopodobieństwem może odpowiadać nadekspresji białka p53 wykazanej w badaniu immunocytochemicznym.

Wykryty wariant genu *TP53* został powiązany w bazach danych z zespołem dziedzicznej predyspozycji do nowotworów (zespołem Li-Fraumenii, OMIM: #151623), jednakże brak potwierdzenia obecności wariantu we krwi obwodowej pacjenta wskazuje na niskie prawdopodobieństwo jego charakteru germinalnego.



Ryc.1. Wizualizacja wariantów strukturalnych. Zewnętrzny okrąg przedstawia ideogram, natomiast wewnętrzny okrąg ilustruje różnicę w pokryciu między próbkami krwi pacjenta, a próbkami moczu. Im ciemniejszy zielony obszar, tym większy stopień amplifikacji. Im ciemniejszy fioletowy kolor, tym większej populacji komórek osadu moczu dotyczy delecja. Geny zostały oznaczone kolorami zgodnie ze zmianami liczby kopii ich *loci*: fioletowy - delecje; zielony - amplifikacje; szary - brak zmian liczby kopii. Połączenia wewnątrz wykresu wizualizują odpowiadające sobie sekwencje. Ilustracja własna.



Ryc. 2. Wizualizacja SNV, małych insercji i delecji. Zewnętrzny okrąg przedstawia ideogram, natomiast wewnętrzne okręgi reprezentują rozkład wariantów. Ciemnoniebieskie kropki oznaczają zdarzenia utraty heterozygotyczności; jasnoniebieskie kropki oznaczają nowe warianty. Zielone kropki reprezentują insercje, a fioletowe kropki reprezentują delecje. Wszystkie geny, analizowane pod kątem obecności zmian somatycznych, są widoczne na wykresie, a geny z wykrytymi istotnymi wariantami są oznaczone na czerwono. Ilustracja własna.

W 2014 roku zaproponowano nową klasyfikację raka pęcherza moczowego opartą na markerach molekularnych w DNA guza[63]. Wyróżnione zostały trzy grupy (A, B i C), które zostały opisane następująco: Grupa A — amplifikacje genów *E2F2/SOX4*, *EGFR*, *PPARG*, *PVRL4*, *YWHAZ*, *MYC* oraz warianty genu *MLL2*; Grupa B — delecja genu *CDKN2A* i warianty aktywujące genu *FGFR3*; Grupa C — warianty genów *TP53* i *RBI*, amplifikacje genów *E2F3* i *CCNE1*. W badanym materiale wykryto zaburzenia molekularne z każdej z powyższych grup, jednak najwyższą zgodność wykazano z grupą C. Przeprowadzona analiza umożliwiła również dopasowanie do biologicznych ścieżek rozwoju guza[94]. W szczególności wykryte warianty odpowiadały zaburzeniom w ścieżce p53/Rb1 oraz zaburzeniom procesu remodelowania chromatyny.

Wykrycie patogennego wariantu genu *TP53* ma również znaczenie farmakogenetyczne. Wskazuje na bardzo prawdopodobną oporność na chemioterapię opartą na cisplatynie[100], co może stanowić kluczową informację dla przyszłej personalizacji terapii pacjenta.

W momencie rozpoznania wykonano również test metylacji Bladder EpiCheck, uzyskując wynik pozytywny (EpiScore: 92). Na kolejnych etapach leczenia pacjenta test wykonano w odstępach 3, 6 i 12 miesięcy od postawienia rozpoznania, uzyskując wyniki negatywne (EpiScore kolejno: 21, 17, 7) – zgodne z wynikami pobieranych w tym samym okresie wycinków podczas monitorujących cystoskopii. Po roku od publikacji omawianej pracy test Bladder EpiCheck został włączony w wytyczne postępowania z pacjentami z nienaciekającymi mięśniówkami rakami pęcherza moczowego Europejskiego Towarzystwa Urologicznego[86], co wskazuje na zgodność wyników uzyskanych w pracy z rezultatami badań w innych ośrodkach.

## **7. Omówienie publikacji drugiej: „Mutacje promotora genu *TERT* jako markery molekularne stanów przednowotworowych raka pęcherza moczowego. Przegląd literatury oraz opis przypadku”.**

### **7.1. Cele pracy**

Artykuł stanowi przegląd wiedzy na temat potencjalnej roli wariantów promotora genu *TERT* jako markerów molekularnych w diagnostyce przesiewowej raka pęcherza moczowego. Ponadto w ramach publikacji przeprowadzono analizę retrospektywną danych uzyskanych w pierwszej publikacji niniejszego cyklu oraz przedstawiono wyniki w formie opisu przypadku.

W pracy wytypowano następujące cele badawcze:

1. Przeprowadzenie przeglądu literatury w celu oceny stanu wiedzy na temat wykrywalności wariantów promotora genu *TERT* w próbkach osadu moczu pacjentów z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego.
2. Ocena skuteczności sekwencjonowania całogenomowego w wykrywaniu wariantów promotora genu *TERT* w próbce DNA uzyskanej z osadu moczu.

### **7.2. Metodyka**

Praca opiera się na przeglądzie literatury dotyczącej genu *TERT*, a w szczególności wariantów w obrębie promotora oraz ich roli w procesie kancerogenezy i potencjalnym zastosowaniu jako markerów molekularnych w diagnostyce raka pęcherza moczowego. Szczegółowy opis metodyki dotyczącej opisu przypadku przedstawiono w omówieniu publikacji pierwszej. Analizę sekwencji genu *TERT* wykonano z użyciem oprogramowania Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.7.2 (Broad Institute, University of California)[88].

### **7.3. Wyniki**

Warianty promotora genu *TERT* opisano jako najczęstsze zaburzenia genetyczne występujące w raku pęcherza moczowego, niezależnie od typu histopatologicznego i stopnia zaawansowania choroby[101,102]. Analiza literatury wykazała, że zmiany te występują w 73%-80% przypadków nienaciekającego mięśniówki raka pęcherza moczowego (ang. non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC) oraz w 53-79% przypadków raka naciekającego mięśniówkę (ang. muscle invasive bladder cancer, MIBC)[101–104]. Najczęściej stwierdzanym wariantem jest NM\_198253.3:c.-124C>T (nazwa tradycyjna: C228T) (83,3%) oraz NM\_198253.3:c.-146C>T (nazwa tradycyjna:

C250T) (12,8%). Inne warianty stwierdza się pojedynczych przypadkach. Ważnym wnioskiem płynącym z literatury jest rozbieżność między odsetkiem wykrywalności wariantów, a zastosowaną metodą laboratoryjną, co wskazuje na potencjał do podniesienia wskaźnika detekcji przy zastosowaniu czulszych metod. Z perspektywy badań przesiewowych istotny jest również fakt, że warianty promotora genu *TERT* można wykryć w komórkach osadu moczu, nawet 10 lat przed diagnozą raka pęcherza moczowego[105].

W opisywanym przypadku klinicznym potwierdzono obecność wariantu C250T w promotorze genu *TERT* w 14 z 22 analizowanych odczytów, co wskazuje na skuteczność sekwencjonowania całogenomowego w wykrywaniu wariantów genu *TERT* z próbek osadu moczu. Wykluczono obecność wariantu w krwi obwodowej pacjenta wskazując na jego charakter somatyczny.

## **8. Omówienie publikacji trzeciej: „Report on the Effect of the Implementation of an Early Detection and Prevention of Cancer Program on Families at High Hereditary Risk-Concentrating on Patients Undergoing Genetic Diagnostics and Counseling in Central Poland”**

### **8.1. Cele pracy**

Artykuł stanowi podsumowanie wyników badań molekularnych wykonanych w ramach programów profilaktycznych Narodowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych: Moduł I – wczesne wykrywanie nowotworów złośliwych w rodzinach wysokiego, dziedzicznie uwarunkowanego ryzyka zachorowania na raka piersi i raka jajnika oraz Moduł II – wczesne wykrywanie i prewencja nowotworów złośliwych w rodzinach wysokiego, dziedzicznie uwarunkowanego ryzyka zachorowania na raka jelita grubego i błony śluzowej trzonu macicy.

W pracy wytypowano następujące cele badawcze:

1. Określenie częstości występowania patogennych wariantów założycielskich w genach *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* i *PALB2* badanych testami celowanymi u pacjentek i pacjentów zakwalifikowanych do Programu.
2. Oceny przydatności klinicznej panelu genów badanych metodą NGS u pacjentek i pacjentów zakwalifikowanych do Modułu I z negatywnymi wynikami badań celowanych.
3. Ocena przydatności klinicznej panelu genów badanych metodą NGS w diagnostyce rodzinnych predyspozycji do nowotworów złośliwych układu pokarmowego oraz raków endometrium.
4. Ocena częstości występowania delecji i duplikacji w grupie osób z podejrzeniem zespołów dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, których badanie nie było przewidziane w Programie.

### **8.2. Metodyka**

#### **8.2.1. Pacjenci**

Przedmiotem pracy była retrospektywna analiza wyników uzyskanych od 1097 pacjentów zakwalifikowanych do Programu. Kwalifikacja do programu odbywała się na podstawie ściśle określonych przez Program kryteriów (poniżej) w ramach Modułu I oraz konsultacji lekarza genetyka klinicznego w ramach Modułu II. Ostatecznie w ramach Modułu I zakwalifikowano 141 osób do grupy najwyższego ryzyka dziedzicznej

predyspozycji do raka piersi i/lub jajnika oraz 372 osoby do grupy ryzyka wysokiego. Niezależnie od grupy ryzyka do testów molekularnych zakwalifikowano 953 osoby. W Module II do badań molekularnych zakwalifikowano 144 pacjentki oraz pacjentów.

#### 8.2.1.1. Kryteria kwalifikacji do grupy najwyższego ryzyka

Do grupy najwyższego ryzyka kwalifikowane były kobiety:

- z rodzin, w których wystąpiły 3 lub więcej zachorowania na raka piersi i/lub jajnika wśród krewnych I° i II° (włączając probantkę),
- u których – niezależnie od obciążenia rodzinnego - wykryto patogenny wariant w obrębie genów *BRCA1*, *BRCA2* lub *PALB2*.

#### 8.2.1.2. Kryteria kwalifikacji do grupy wysokiego ryzyka

Wysokie ryzyko zachorowania na raka piersi i/lub jajnika stwierdzano:

- w rodzinach, w których wystąpiły 2 zachorowania na te nowotwory u probantki lub wśród krewnych I° i II° (lub 2 zachorowania wśród krewnych II° i III° ze strony ojca) - w tym zwłaszcza, gdy przynajmniej u jednej chorej rozpoznano raka jajnika, a jedno zachorowanie wystąpiło przed 50 r.ż.,
- w rodzinach, w których rozpoznano obustronnego raka piersi (krewni I° i II°),
- w rodzinach, w których stwierdzono raka piersi przed 40 r. ż. (krewni I° i II°),
- w rodzinach, w których stwierdzono raka piersi u mężczyzny (krewni I° i II°).

#### 8.2.1.3. Kryteria kwalifikacji do badania wariantów założycielskich *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* i *PALB2*

Do badań w kierunku nosicielstwa najczęstszych wariantów w genie *BRCA1* oraz wariantu genu *BRCA2* kwalifikowano:

- wszystkie chore na raka jajnika/jajowodu/otrzewnej,
- wszystkie chore, u których rozpoznano raka piersi,
- krewnych I° i II° osób z rakiem piersi i/lub jajnika w przypadku, gdy wariant rodzinny nie został ustalony i brak możliwości rozpoczęcia diagnostyki od osoby chorej na raka.

Do badania trzech najczęstszych wariantów skracających białko w populacji polskiej w genie *CHEK2* oraz dwóch najczęstszych wariantów w genie *PALB2* kwalifikowano:

- wszystkie chore z rakiem piersi;



- krewnych I° osób z rakiem piersi z rodzin spełniających kryteria wysokiego i najwyższego ryzyka raka piersi.

#### 8.2.1.4. Kryteria kwalifikacji do badania NGS

Badanie wykonywano wyłącznie u chorych na raka piersi i/ lub jajnika, u których nie wykryto najczęstszych wariantów genu *BRCA1*, pod warunkiem, że:

- u chorej rozpoznano raka piersi lub raka jajnika i posiada ona krewnego I° i/lub II°, u którego rozpoznano raka piersi i/lub raka jajnika, a przynajmniej jedno z tych zachorowań wystąpiło przed 50 rokiem życia (spełnione kryteria kliniczno-rodowodowe zespołu dziedzicznego raka piersi i/ lub raka jajnika),
- u chorej rozpoznano raka piersi przed 50 rokiem życia lub raka jajnika w dowolnym wieku i posiada ona krewnego I° i/lub II°, u którego rozpoznano raka piersi (rak piersi u mężczyzny) i/lub raka jajnika,
- u tej samej chorej rozpoznano raka piersi i raka jajnika lub obustronnego raka piersi w tym  $\geq 1$  poniżej 50 r.ż.,
- u chorej rozpoznano raka jajnika i posiada ona przynajmniej jedną krewną, u której raka piersi wykryto przed 50 rokiem życia lub u której rozpoznano raka jajnika.

#### 8.2.2. Metody

W ramach testów przesiewowych w kierunku najczęściej występujących w populacji polskiej wariantów w genie *BRCA1* badano zmiany: c.68\_69del, c.181T>G, c.1961del, c.3700\_3704del, c.3756\_c759del, c.4035del oraz c.5266dup. W genie *BRCA2* wykrywano wariant c.5946del. Dodatkowo, identyfikowano trzy najczęściej występujące warianty skracające białko w genie *CHEK2*: c.1100del, c.444+1G>A oraz c.909-?\_1095+?del, a także dwa najczęściej spotykane warianty w genie *PALB2*: c.172\_175del i c.509\_510del. Badanie wariantów w genach *BRCA1* i *BRCA2* przeprowadzono przy użyciu panelu Oncogenetics BRCA R-27/P-48FRT opartego na reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) (Sacace Biotechnologies, Como, Włochy). Reakcję Real-Time PCR (RT-PCR) wykonano za pomocą instrumentu RotorGene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). Analiza uzyskanych wyników była prowadzona przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene Q 2.1.0.9 (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). Do badania najczęstszych wariantów w genach *CHEK2* i *PALB2* zastosowano tradycyjne sekwencjonowanie metodą Sanger. Ponadto, sekwencjonowanie metodą Sanger było preferowaną metodą do testowania nosicielstwa wariantów rodzinnych, gdy test RT-PCR nie pozwalał na ich wykrycie. Pełne sekwencjonowanie genów *BRCA1* i *BRCA2*

z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji było realizowane przez podwykonawców. W uzasadnionych przypadkach proces diagnostyczny uzupełniano o analizę dużych delecji i duplikacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*, przy użyciu metody MLPA z zestawami SALSA MLPA Probemix P002-D1-0918 i SALSA MLPA Probemix P045 D1-0519, oraz o pełne sekwencjonowanie innych genów związanych z predyspozycjami do nowotworów, oprócz *BRCA1* i *BRCA2* (w tym takich genów jak: *AKT1*, *APC*, *ATM*, *AXIN2*, *BARD1*, *BMPR1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDC73*, *CDH1*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *CTNNA1*, *DICER1*, *EPCAM*, *FANCC*, *FH*, *GALNT12*, *GDNF*, *GREM1*, *HNFI1A*, *HNFI1B*, *HOXB13*, *KIF1B*, *MAX*, *MC1R*, *MEN1*, *MET*, *MITF*, *MLH1*, *MLH3*, *MRE11*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PIK3CA*, *PMS2*, *POLD1*, *POLE*, *POT1*, *PRKARIA*, *PRSSI*, *PTCH1*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RBI*, *RET*, *SDHA*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SMAD4*, *STK11*, *TERT*, *TGFBR2*, *TMEM127*, *TP53*, *TSC1*, *TSC2*, *VHL*, *WT1*, *XRCC2* i *XRCC3*).

W Module II zastosowano ten sam panel 70 genów (w tym szczegółową analizę genów *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *STK11*, *SMAD4*, *BMPR1A*, *EPCAM* i *MUTYH*) do celów diagnostycznych z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji oraz zestawów MLPA dedykowanych do identyfikacji delecji i duplikacji w genach związanych z określonymi diagnozami klinicznymi.

### 8.3. Wyniki

W przeprowadzonych 880 badaniach na obecność wariantów założeńskich w genach *BRCA1* i *BRCA2* wykryto 39 wariantów, co stanowi 4.43% osób zakwalifikowanych do testu przesiewowego. 22 spośród powyższych 39 wariantów zidentyfikowano w grupie najwyższego ryzyka (15.60% osób zakwalifikowanych), 11 w grupie wysokiego ryzyka (2.96% osób zakwalifikowanych) oraz 6 w grupie pacjentek i pacjentów zakwalifikowanych do badań, ale nie spełniających kryteriów włączenia do grup wysokiego i najwyższego ryzyka (1.63%). W grupie 843 osób zakwalifikowanych do badania w kierunku wariantów markerowych *CHEK2* i *PALB2* wykryto odpowiednio 9 wariantów (wyłącznie w grupie najwyższego ryzyka) i 3 warianty (tylko w grupie wysokiego ryzyka). Do badania panelu genów techniką NGS zakwalifikowano 55 osób i wykryto 10 wariantów patogennych (18.18%). Badanie techniką MLPA w kierunku delecji bądź duplikacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* wykonano odpowiednio u 70 i 62 pacjentek, uzyskując 3 wyniki pozytywne w zakresie wariantów *BRCA1* (4.29%) i 2 wyniki pozytywne w zakresie wariantów *BRCA2* (3.33%). W ramach diagnostyki zespołów predyspozycji do raków jelita grubego i/lub endometrium wykryto 25

wariantów patogennych bądź potencjalnie patogennych co stanowiło 17.36% badanej grupy. Zgodnie z częstością populacyjną najczęściej stwierdzano warianty genu *APC* oraz warianty w obrębie genów mutatorowych związanych z zespołem Lyncha. Wbrew oczekiwaniom wynikającym z danych literaturowych nie wykryto rozległych delecji/duplikacji metodą MLPA w żadnym przypadku. Zaskakującym faktem było stwierdzenie wariantów w obrębie genów predysponujących do raków piersi i jajnika (dwóch przypadków wariantów *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *NBN* oraz trzech przypadków wariantów *ATM*) w grupie osób zakwalifikowanych do Modułu II.

## 9. Wnioski z cyklu publikacji

1. Sekwencjonowanie całogenomowe umożliwia identyfikację charakterystycznych dla raka pęcherza moczowego *in situ* zmian genetycznych, w tym potencjalnych markerów terapii celowanych oraz wariantów związanych z zespołami dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, w DNA izolowanym z próbki moczu.
2. Równoległe sekwencjonowanie genomu komórek nowotworowych oraz limfocytów krwi obwodowej przy zastosowaniu odpowiednich narzędzi bioinformatycznych stanowi efektywną formę identyfikacji charakteru somatycznego lub germinального wykrytych zmian.
3. Test Bladder EpiCheck jest efektywnym testem nieinwazyjnym mogącym poprawić monitorowanie pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, w szczególności w sytuacjach klinicznych, które obniżają czułość i swoistość rutynowych metod diagnostycznych (takich jak terapia szczepionką BCG).
4. Warianty C228T i C250T w obrębie promotora genu *TERT* wykrywane w próbkach moczu znacząco wyprzedzają objawową fazę raka pęcherza moczowego i po opracowaniu efektywnej ekonomicznie i jakościowo metody mogłyby stanowić użyteczne narzędzie dla celów diagnostyki przesiewowej.
5. Panele genów badane metodą NGS są efektywnym narzędziem diagnostyki dziedzicznych predyspozycji do nowotworów. Stosowanie szerokich paneli tumoragnostycznych wydaje się być najbardziej efektywną strategią diagnostyczną pod względem odsetka wykrywalności wariantów patogennych. Zastosowanie tego podejścia zmniejsza rolę kryteriów rodowodowo-klinicznych w kwalifikacji do badań genetycznych.

## 10. Podsumowanie

Zaprezentowany cykl publikacji omawia zastosowanie zaawansowanych technik molekularnych w diagnostyce nowotworów złośliwych tkanki nabłonkowej, na przykładzie raka pęcherza moczowego oraz wykrywaniu podłoża genetycznego zespołów dziedzicznych predyspozycji do nowotworów.

W pierwszej publikacji przedstawiono wykorzystanie sekwencjonowania całego genomu w identyfikacji wariantów molekularnych w próbkach DNA wyizolowanych z osadu moczu oraz krwi obwodowej. Przeprowadzona diagnostyka pozwoliła na wykrycie typowych zmian genetycznych dla raka pęcherza moczowego, zakwalifikowanie guza do odpowiedniego podtypu molekularnego, wytypowanie potencjalnych markerów terapii celowanych, identyfikację możliwego czynnika predysponującego w postaci wariantu genu *TP53* oraz jednoczesne wykluczenie germinального charakteru tej zmiany. Każdy z powyższych elementów został oceniony w ramach jednej analizy, co wskazuje na znaczącą przewagę sekwencjonowania wysokoprzepustowego nad aktualnie stosowanym podejściem etapowym. Wykorzystanie techniki NGS, choć droższe od metod celowanych, pozwoliło na uzyskanie zdecydowanie większej ilości informacji w znacznie krótszym czasie. Diagnostyka tego typu stwarza jednak wiele trudności interpretacyjnych, a więc wymaga wysokich kompetencji i doświadczenia, często wielodyscyplinarnego. Może to stanowić istotny problem w implementacji technik wysokoprzepustowych do praktyki klinicznej, zwłaszcza w krajach o niewielkiej liczbie specjalistów z zakresu genetyki, takich jak Polska. Analizując wyniki pierwszej publikacji warto zwrócić uwagę na historię choroby pacjenta, od którego uzyskano materiał do badań. Pierwsze objawy wystąpiły w wieku 56 lat i sugerowały łagodny rozrost gruczołu krokowego, które to rozpoznanie zostało potwierdzone w cystoskopii. Rozrost gruczołu krokowego występuje nawet u 50% mężczyzn w wieku 51-60 lat[106], a w związku z tym jest znacznie częstszą przyczyną objawów z dolnego odcinka dróg moczowych niż rak pęcherza moczowego, który w tym przedziale wiekowym, dotyka około 0,00015% mężczyzn[107]. Tak istotna różnica w epidemiologii, podobieństwo objawów oraz ryzyko wyników fałszywie negatywnych badań będących złotym standardem postępowania (czułość cystoskopii w diagnostyce raków pęcherza moczowego *in situ* wynosi 55%[108]) stwarzają możliwość przeoczenia współwystępowania tych dwóch jednostek chorobowych. W opisywanym przypadku pogłębienie diagnostyki nastąpiło dopiero po 5 latach nieskutecznego leczenia

i zaobserwowaniu zmian w obrębie ściany pęcherza w ultrasonografii transrektalnej, która, co warto zauważyć, nie jest standardem postępowania w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego. Wydaje się, że włączenie testu o wysokiej czułości, a w szczególności swoistości w wykrywaniu raków pęcherza moczowego do algorytmu postępowania u pacjentów i pacjentek z dolegliwościami z dolnego odcinka dróg moczowych mogłoby obniżyć ryzyko przeoczenia rozpoznania nowotworu złośliwego tego narządu.


Testem takim mogłoby być badanie celowane na obecność wariantów C228T i C250T w obrębie promotora genu *TERT*, które, jak przedstawiono w drugiej pracy cyklu, cechują się 100% swoistością oraz znacznym, nawet 10 letnim, wyprzedzeniem objawowej fazy choroby. Retrospektywna analiza sekwencjonowania całogenomowego wykonanego w ramach pierwszej pracy wykazała obecność wariantu C250T u opisywanego pacjenta. Problemem, który stoi na przeszkodzie w implementacji takiego testu, jest brak opracowanej metody diagnostycznej o wystarczająco wysokich parametrach wykrywalności przy zachowaniu efektywności ekonomicznej. Omawiana publikacja stanowiła punkt wyjścia dla opracowania w Zakładzie Genetyki Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki metody, która spełnia wszystkie wymagania stawiane testom przesiewowym oraz aktualnie poddawana jest procedurze zgłoszenia patentowego.

W trzeciej z zaprezentowanych prac podsumowano doświadczenia z zakresu diagnostyki genetycznej rodzinnych predyspozycji do nowotworów, w tym raka piersi, jajnika, jelita grubego i endometrium. Wyniki uzyskane w badaniu wpisują się w aktualne trendy opisywane we wstępie do prezentowanej rozprawy. Zastosowanie szerokich paneli NGS znacząco zwiększa odsetek wykrywalności rodzin z dziedzicznymi predyspozycjami do nowotworów. Szczególnie interesujące wydają się być wyniki uzyskane w ramach Modułu II, dotyczącego raka jelita grubego oraz endometrium. Aż 8/25 wykrytych wariantów patogennych (32%) stanowiły zmiany tradycyjnie kojarzone z nowotworami piersi, jajnika oraz prostaty. Żadna z 8 osób, u których wykryto powyższe warianty nie spełniała kryteriów kwalifikacji do panelu NGS przewidzianych w Module I oraz nie zostałaby zdiagnozowana gdyby wykorzystany w Module II panel zawierał wyłącznie geny przewidziane regulaminem Programu. Wydaje się, że diagnostyka predyspozycji rodzinnych powinna być oferowana szerszemu gronu pacjentów niż wynikałoby to z kryteriów rodowodowo-klinicznych. Podobnie jak w przypadku badań somatycznych zastosowanie diagnostyki z wykorzystaniem metody NGS w badaniach

germinalnych stwarza problemy z interpretacją uzyskanych wyników. Możliwość wykrywania zmian o niepewnym znaczeniu klinicznym, nowych wariantów indywidualnych czy też wariantów powodujących niewielki wzrost ryzyka zachorowania na nowotwory znacząco komplikuje proces poradnictwa genetycznego oraz przygotowywania zaleceń profilaktycznych. Jednakże, zwiększenie popularności technik wysokoprzepustowych niewątpliwie spowoduje wzrost poziomu wiedzy, który stopniowo będzie minimalizował wymienione powyżej trudności. Bardzo ważnym aspektem przy implementacji badań wysokoprzepustowych do praktyki klinicznej jest kwestia obciążenia finansowego dla systemów opieki zdrowotnej. Wyznaczenie granicy między wykrywalnością, a opłacalnością stanowi istotne wyzwanie i wpływa na tempo wdrażania nowych technik diagnostycznych do praktyki. W chwili obecnej wydaje się, że optymalnym podejściem do diagnostyki molekularnej dziedzicznych predyspozycji do nowotworów będzie stosowanie szerokich paneli tumor-agnostycznych u pacjentów z postawionym rozpoznaniem onkologicznym, prawdopodobnie równoległe z diagnostyką somatyczną. W przypadku rodzin, w których nie ma możliwości rozpoczęcia diagnostyki od osoby dotkniętej chorobą rozsądnym wydaje się korzystanie z tanich testów przesiewowych wykrywających częste w populacji warianty założeńielskie, które pozwalają na zidentyfikowanie większości nosicieli i nosicielek.

## Article

# The Usefulness of Cell-Based and Liquid-Based Urine Tests in Clarifying the Diagnosis and Monitoring the Course of Urothelial Carcinoma. Identification of Novel, Potentially Actionable, *RB1* and *ERBB2* Somatic Mutations

Tadeusz Kałużewski <sup>1,2,\*</sup>, Grzegorz K. Przybylski <sup>3,4</sup>, Michał Bednarek <sup>1</sup>, Sławomir Glazar <sup>5</sup>, Magdalena Grabiec <sup>1</sup> , Adam Jędrzejczyk <sup>6</sup>, Łukasz Kępczyński <sup>1,2</sup>, Izabela Kubiak <sup>1</sup>, Dorota Kucharska <sup>1</sup>, Agnieszka Morel <sup>1</sup>, Magdalena Owczarek <sup>1</sup>, Marek Roźniński <sup>7</sup>, Jordan Salamunia <sup>1</sup>, Dominika Szewczyk <sup>1</sup>, Jarosław Szwałski <sup>8</sup> and Bogdan Kałużewski <sup>1</sup>



**Citation:** Kałużewski, T.; Przybylski, G.K.; Bednarek, M.; Glazar, S.; Grabiec, M.; Jędrzejczyk, A.; Kępczyński, Ł.; Kubiak, I.; Kucharska, D.; Morel, A.; et al. The Usefulness of Cell-Based and Liquid-Based Urine Tests in Clarifying the Diagnosis and Monitoring the Course of Urothelial Carcinoma. Identification of Novel, Potentially Actionable, *RB1* and *ERBB2* Somatic Mutations. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 362. <https://doi.org/10.3390/jpm11050362>

Academic Editor: Ramesh Narayanan

Received: 11 March 2021

Accepted: 22 April 2021

Published: 30 April 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Laboratory of Medical Genetics of the “Genos” Partnership—R&D Division, 91-033 Lodz, Poland; [michalbednarek@genos.com.pl](mailto:michalbednarek@genos.com.pl) (M.B.); [magrabiec@gmail.com](mailto:magrabiec@gmail.com) (M.G.); [lukasz.kepczynski@iczm.edu.pl](mailto:lukasz.kepczynski@iczm.edu.pl) (Ł.K.); [iza.kubiak@genos.com.pl](mailto:iza.kubiak@genos.com.pl) (I.K.); [genos\\_stronsko@op.pl](mailto:genos_stronsko@op.pl) (D.K.); [agnieszka.morel@genos.com.pl](mailto:agnieszka.morel@genos.com.pl) (A.M.); [magdalenaowczarek@genos.com.pl](mailto:magdalenaowczarek@genos.com.pl) (M.O.); [jordan.salamunia@genos.com.pl](mailto:jordan.salamunia@genos.com.pl) (J.S.); [dominika.szewczyk@genos.com.pl](mailto:dominika.szewczyk@genos.com.pl) (D.S.); [b.kaluzewski42@gmail.com](mailto:b.kaluzewski42@gmail.com) (B.K.)
- <sup>2</sup> Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, 93-338 Lodz, Poland
- <sup>3</sup> Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, 60-479 Poznan, Poland; [grzegorz\\_przybylski@yahoo.com](mailto:grzegorz_przybylski@yahoo.com)
- <sup>4</sup> MyGenome Laboratory, 60-461 Poznan, Poland
- <sup>5</sup> Department of Pathomorphology, District Hospital, 98-220 Zdunska Wola, Poland; [s.glazar@szpital-zdwola.info](mailto:s.glazar@szpital-zdwola.info)
- <sup>6</sup> Department of Urology, District Hospital, 97-500 Radomsko, Poland; [adam46xy@gmail.com](mailto:adam46xy@gmail.com)
- <sup>7</sup> Lekarzy Urologów Marek Roźniński i Partnerzy, Non-public Department of Urology, 98-100 Lask, Poland; [rozmaryn68@gmail.com](mailto:rozmaryn68@gmail.com)
- <sup>8</sup> CYTOPATH S.A., Histopathological Laboratory, 90-552 Lodz, Poland; [szw2000@poczta.onet.pl](mailto:szw2000@poczta.onet.pl)
- \* Correspondence: [t.kaluzewski@genos.com.pl](mailto:t.kaluzewski@genos.com.pl); Tel.: +48-791-079-576

**Abstract:** Bladder cancer is one of the most common cancers in global statistics. One of the issues associated with this disease is the high incidence of cases with delayed diagnosis and what factors correlate with worse treatment outcomes. A possible reason for this may be the rather limited availability of non-invasive diagnostic tools. This short communication presents a case of a 68 year old male patient after an ineffective therapy, carried on for several years with symptoms commonly associated with prostate overgrowth that masked a carcinoma in situ of the urinary bladder. Implementation of several diagnostic techniques, including urine sediment cytology, immunocytochemistry, the fluorescence in situ hybridisation technique, the Bladder EpiCheck test and whole-genome sequencing, enabled the establishment of a correct diagnosis, implementation of appropriate treatment and provision of patient-friendly monitoring. The described case emphasises the usefulness of cell-based and liquid-based urine tests in bladder cancer diagnostic procedures.

**Keywords:** bladder cancer; urinary cytology; FISH; Bladder EpiCheck; non-invasive urine tests; WGS, urinary carcinoma

## 1. Introduction

### 1.1. Background

In global statistics, bladder cancer (BC) is the sixth and seventeenth most common cancer in men and women, respectively [1]. In 2018, 7494 new cases of BC were recorded in Poland (5612 in men—ranking the 5th, and 1882 in women—ranking the 13th in malignancy incidence in Poland), out of whom 3973 died (3073 men and 900 women) [2]. In the European Union countries, the total mortality rate from urinary bladder cancer stabilised



at the beginning of the 1990s of the previous century and has gradually been falling since then, except in Bulgaria, Poland and Romania. During the years 2005–2008, Poland ranked the first with regards to the mortality rate from urinary bladder cancer [3]. One possible reason could have been the limited access to urinary cytology, caused by financial and local administrative issues. That situation restricted urologists to cystoscopy and precluded the usage of sensitive non-invasive tests. Here we attempt to emphasise the usefulness of voided urine examinations in bladder cancer diagnostics, proven in the case of a male patient with coexisting benign prostate hyperplasia and a carcinoma in situ of the urinary bladder.

### 1.2. Patient's Medical History

In the presented case, a 61 year old male, working for 48 years in the metal processing industry and a tobacco smoker (10 pack-years), reported lower urinary tract symptoms (LUTS) to his general practitioner, including urinary hesitancy, poor stream and recurrent signs of bladder inflammation. After ineffective primary treatment with furazidone, the patient was referred to a urologist who started therapy with tamsulosin. Due to the lack of any improvement, finasteride was added to the treatment regimen, as well as an antibiotic therapy with several different agents was implemented. The above-mentioned treatment lasted from 2013 to 2018 with a rather poor clinical outcome—the patient began to suffer from a gradually developing nocturia. In 2018, the patient turned up at the Genos Outpatient Clinic where transrectal ultrasonography (TRUS) revealed an exophytic discrete lesion in the bladder triangle. Non-invasive urine tests were applied. The results of the performed diagnostics and the outcome of an introduced treatment are described below.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cytourofish<sup>(+)</sup>

The Cytourofish<sup>(+)</sup> is a comprehensive test consisting of urinary sediment cytology and fluorescence in situ hybridisation (FISH) procedure, using a tricolour molecular probe, specific for the 9p21 chromosomal region and for the centromeres of chromosomes 9 and 17. Depending on the initial test results (cytology plus FISH), the reactions of immuno-cytochemical expression are carried out with chosen antigens out of: p53, Ki67, CK20, or PCNA.

#### 2.1.1. Urinary Cytology

A specimen was obtained with the use of the “CYTOSET” cytology set (MPW MED. INSTRUMENTS, Warsaw, Poland). The routine Papanicolaou staining procedure was carried out without any modifications. The urinary cytology was evaluated in accordance with The Paris System for Reporting Urinary Cytology [4].

#### 2.1.2. FISH

A FISH examination was performed in accordance with an internal laboratory procedure (see Appendix A). The scope of normal values: a loss of the 9p21 region <5/100 cellular nuclei, the polysomy of chromosome 9 and chromosome 17 as the sum of <5/100 cellular nuclei. A “custom-made” probe was designed and set up by the PanPath Company (Budel; The Netherlands).

#### 2.1.3. Immunocytochemical Staining

In the presented case, cytochemical reactions were done in accordance with an internal laboratory procedure (see Appendix B). The results of p53 staining were expressed as a percentage with a cut-off value, established at 50%.

### 2.2. Bladder EpiCheck

The Bladder EpiCheck (Nucleix; Rehovot, Israel) test is based on an analysis of the panel of 15 DNA (deoxyribonucleic acid) biomarkers, associated with urinary bladder

carcinoma. The test requires small amounts of DNA, isolated from easily available urine samples, while being simultaneously characterised by very high, clinically proven sensitivity, specificity and negative predictive value [5]. The Bladder EpiCheck test has been designed for the non-invasive monitoring of malignant relapses. The Bladder EpiCheck test enables the determination of the EpiScore, which is a measure of the overall biomarker panel methylation level, ranging from 0 to 100. The test cut-off is the EpiScore of 60, meaning that all the results, either equal to or above 60, are considered positive, while those below 60 are considered negative. The Bladder EpiCheck test was performed on a Rotor Gene Q instrument (Qiagen; Venlo, The Netherlands), following the kit operating manual without any modifications.

### 2.3. DNA Isolation and Whole Genome Sequencing (WGS)

DNA was extracted from urine sediment and whole blood samples. DNA isolation was performed using a commercially available Sherlock AX kit (A&A Biotechnology, Gdansk, Poland), according to the manufacturer's instructions. The purity and concentration of extracted DNA samples were assessed using an Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Hamburg, Germany). The DNA concentration was 426.9 µg/mL for blood and 76.9 µg/mL for urine samples. Whole-genome sequencing of both sample types was performed at the Beijing Genome Institute (BGI, Hong Kong) by Next Generation Sequencing (NGS).

### 2.4. Bioinformatic Analysis

The analysis of WGS results was performed by means of bioinformatics tools, as well as by manual evaluation in the Integrative Genomics Viewer (IGV) browser v2.7.2 (Broad Institute, University of California) [6]. The identification of single nucleotide variations, short insertions and deletions, as well as discrimination of germline/somatic origin of mutations was performed by the VarScan v2.4.4 program [7] after data conversion to the mpileup format by the SAMtools v1.10 software [8]. The structural variant (SV) calling was performed with Delly [9] in case of translocations and bamCompare function of deepTools v2.0 [10] in case of deletions and amplifications. The graphic presentation of obtained data was visualised in the perl environment with the Circos v0.69.9 software [11].

## 3. Results

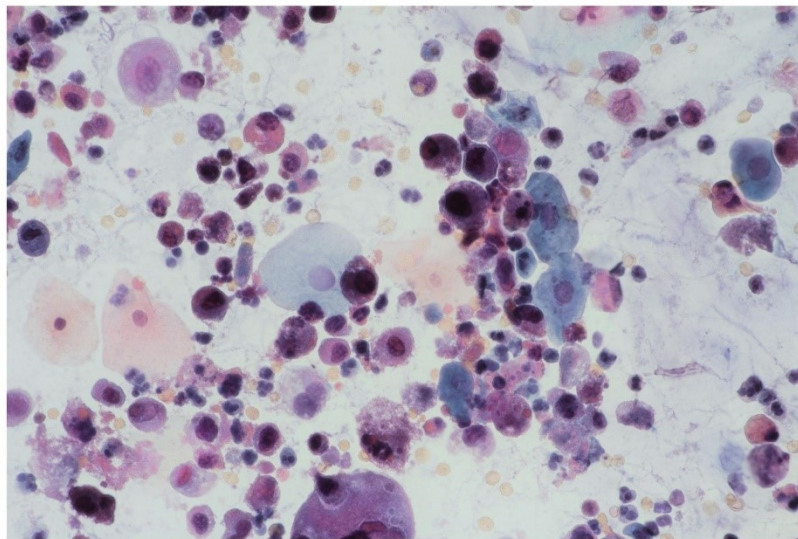
### 3.1. *Cytourofish*<sup>(+)</sup>

In multifocal urothelial carcinoma in situ (CIS), neoplastic cells are characterised by the reduction of cohesion forces, which makes them easier to identify by urine sediment cytology, comparing to other cancers of the urothelial tract [12]. An analysis of cytological specimens enables to identification of high-grade urothelial carcinoma (HGUC), based on The Paris System for Reporting Urinary Cytology (see Figure 1).

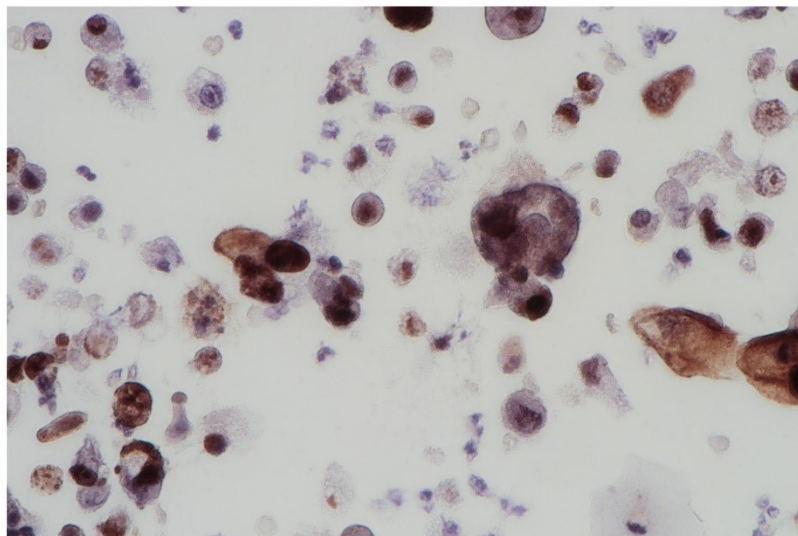
The FISH procedure enables detection of cells with genomic alternations in the 9p21 region. A homo- (24% of examined cells) and heterozygous (60% of examined cells) losses in 9p21 locus were found. No numerical aberrations were detected by the probes specific for chromosome 17 and 9 centromeres. In the studied case, the immunocytochemical expression of the p53 gene was also examined; its presence was found out in 62% of urine sediments (with nuclear reaction in 40% and cytoplasmic reaction in 22%). A clearly positive reaction, i.e., above 50%, allows for differentiating neoplastic cells of the urothelium with reactive atypia (see Figure 2).

### 3.2. Bladder EpiCheck

In the presented case, the EpiScore value was 92, which represented a positive result of the Bladder EpiCheck test.



**Figure 1.** Urine sediment—a cytological specimen. Papanicolaou staining. Urothelial carcinoma cells with a high N/C (nucleus/cytoplasm) ratio (~30% of cells with N/C ratio  $\geq 0.7$  and ~20% with N/C ratio  $\geq 0.5$  and  $< 0.7$ ), nuclear margin irregularity and hyperchromasia. Prominent single or multiple nucleoli and mitoses. An inflammatory background of the specimen is visible with numerous granulocytes and erythrocytes.



**Figure 2.** Urine sediment—a cytological specimen. The immunocytochemical reaction of p53. A dominating picture of positive p53 reactions, both nuclear and cytoplasmatic. Single large cells are filled with haemosiderin.

### 3.3. Whole Genome Sequencing (WGS)

#### 3.3.1. Structural Variations (SV)

Somatic SV's can be defined as copy number alternations (CNAs), large deletions and amplifications, as well as chromosomal inversions and translocations. Bladder cancer usually contains around 300 SV's per case [13]. Particular attention was paid to the most common alternations, observed in BC samples [13] (see Table 1). In the presented case, we managed to recognise 338 corresponding sequences within the genome and a variety of amplifications and deletions (see Figures 3 and 4). A coverage analysis of chromosome 9, with the resolution levels of 1 kb and 10 kb, confirmed the 9p21 deletion, detected originally by Cytourofis<sup>®</sup>. Additionally, WGS revealed a deletion of the first 22 Mb of its short arm (9p22–24). The deleted region contained over 300 genes, including cyclin dependent kinase inhibitor 2A gene (*CDKN2A*) and SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2 gene (*SMARCA2*). In addition, a 900 kb amplification was found at the position of 32.9 M–33.9 M that was rearranged to an amplified region of chr10, at the position of 35.5 Mb. That rearrangement, corresponding to unbalanced translocation t(9;10)(p13;p11), juxtaposed the serine protease 3 (*PRSS3*) and the ankyrin repeat domain 30A (*ANKRD30A*) genes. Another rearrangement, corresponding to unbalanced translocation t(4;17)(q31;q24), disrupted the transmembrane 131 like (*TMEM131L*) and the solute carrier family 39 member 11 (*SLC39A11*) genes, by fusing head to head the first 3 exons of *TMEM131L* and the first 5 exons of *SLC39A11*. The attention was also drawn by a lot of corresponding sequences between 1q23.3–24.1 and 11q13.3.

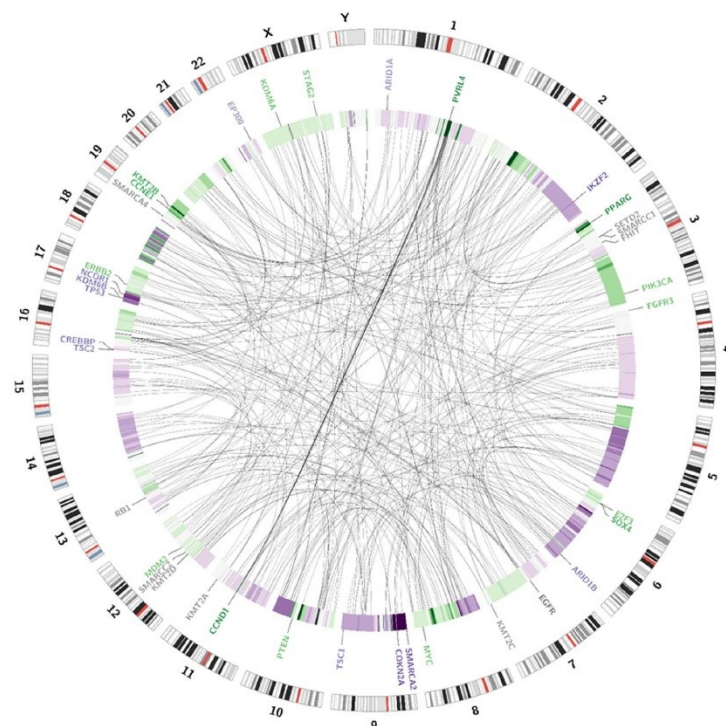
**Table 1.** Most frequent amplifications and deletions, observed in the bladder cancer, and their presence in the described case.

Amplifications		
Chromosomal Locus	Gene	Presence in the Evaluated Case
6p22.3	<i>E2F3</i>	Yes
6p22.3	<i>SOX4</i>	Yes
11q13.3	<i>CCND1</i>	Yes
7p11.2	<i>EGFR</i>	-
17q12	<i>ERBB2</i>	Yes
19q12	<i>CCNE1</i>	Yes
3p25.2	<i>PPARG</i>	Yes
12q15	<i>MDM2</i>	Yes
8q24.21	<i>MYC</i>	Yes
4p16.3	<i>FGFR3</i>	Yes
1q23.3	<i>PVRL4</i>	Yes
3q26.32	<i>PIK3CA</i>	Yes
Deletions		
9p21.3	<i>CDKN2A</i>	Yes
2q34	<i>IKZF2</i>	Yes
13q14.2	<i>RB1</i>	-
3p14.2	<i>FHIT</i>	-
16p13.3	<i>CREBBP</i>	Yes
17p12	<i>NCOR1</i>	Yes
12q13.12	<i>KMT2D</i>	-
11q23.3	<i>KMT2A</i>	-
7q36.1	<i>KMT2C</i>	-
19q13.12	<i>KMT2B</i>	-
22q13.2	<i>EP300</i>	Yes
1p36.11	<i>ARID1A</i>	Yes
6q25.3	<i>ARID1B</i>	Yes
9p24.3	<i>SMARCA2</i>	Yes
19p13.2	<i>SMARCA4</i>	-

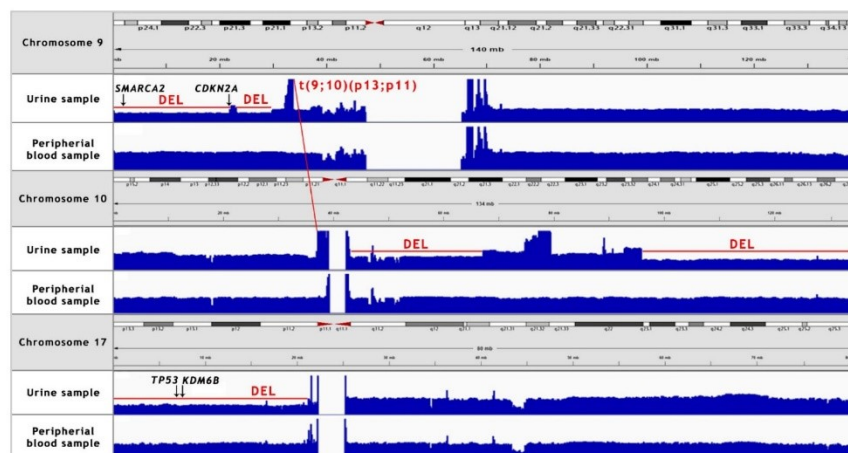


Table 1. Cont.

Chromosomal Locus	Amplifications	
	Gene	Presence in the Evaluated Case
3p21.31	SMARCC1	-
12q13.2	SMARCC2	-
9q34.13	TSC1	Yes
16p13.3	TSC2	Yes
10q23.31	PTEN	-
3p21.31	SETD2	-
17p13.1	KDM6B	Yes
Xp11.3	KDM6A	-
Xq25	STAG2	-
17p13.1	TP53	Yes



**Figure 3.** Visualisation of structural variations. The external circle represents an ideogram, while the internal circle illustrates the coverage difference between the patient's blood samples and urine samples. The darker the green area, the larger are the amplification rates. The darker the purple colour, the larger is the deletion. Genes are coloured according to the copy number alternations of their loci: purple—deletions; green—amplifications; grey—no change in copy number. The link inside the graph visualises the pattern of corresponding sequences.

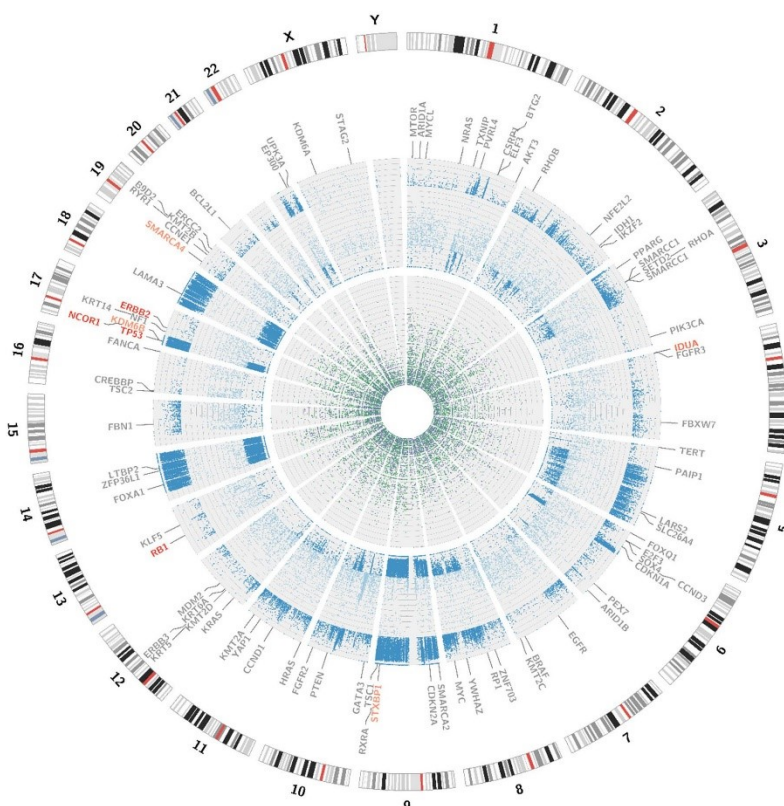


**Figure 4.** NGS coverage visualisation of the copy number variations (CNV's) of chromosomes 9, 10 and 17 in the urine sample, as compared to the peripheral blood sample. A manual analysis enabled to confirm the deletion of 9p21 locus. Additionally, 9p22–24 deletion, two major deletions in long arm of chromosome 10, 17p deletion and translocation between chromosomes 9 and 10 were recognised. “DEL” stands for deletion.

### 3.3.2. Single Nucleotide Variations, Deletions and Insertions

Variant calling enables the presentation of numerous single nucleotide variations (SNVs), short insertions (ranging from 1 bp to 26 bp) and deletions (ranging from 1 bp to 38 bp). All of the alternations present in the coding sequences of the patient genome are presented on a circular graph (see Figure 5). The chosen genes, frequently affected in bladder cancer, were additionally checked with the IGV browser (please refer to Appendix C for a complete list of manually analysed genes).

The most clinically relevant finding was the somatic missense pathogenic variant of the tumour protein p53 gene (*TP53*) c.524G>T (p.Arg175Leu) that was associated with loss of heterozygosity (LOH). Further, the following unreported somatic heterozygous missense variants were found: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 gene (*ERBB2*) c.2180G>C (p.Gly727Ala), RB transcriptional corepressor 1 gene (*RB1*) c.2726C>T (p.Thr909Ile) and *RB1* c.1054G>C (p.Glu352Gln), and a somatic heterozygous synonymous variant of alpha-L-iduronidase gene (*IDUA*) c.2064G>A (p.Lys688=). Additionally, we recognised associated with LOH germline missense variants: lysine demethylase 6B gene (*KDM6B*) c.2917A>C (p.Lys973Gln) and syntaxin binding protein 1 gene (*STXBPI1*) c.1127C>T (p.Thr376Ile), and associated with LOH germline synonymous variants of latent transforming growth factor beta binding protein gene 2 (*LTBP2*) and actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 gene (*SMARCA4*). We also identified germline heterozygous missense variants of: nuclear receptor corepressor 1 gene (*NCOR1*) c.59A>C (p.Tyr20Ser) and *IDUA* c.1554A>C (p.Leu518Phe) (see Table 2).



**Figure 5.** Visualisation of SNPs, insertions and deletions. The external circle represents an ideogram, while the internal circles represent the distribution of mutations. The dark blue dots stand for the loss of heterozygosity events; the light blue dots for novel mutations. The green dots represent insertions and the purple dots represent deletions. All the genes, analysed for the presence of somatic mutations are visible on the graph, the affected genes are marked red.

**Table 2.** Selected mutations with a potential impact on bladder cancer development. Clinical significance based on varsome.com.

Gene	Variant	Percentage of Reads Blood Sample	Percentage of Reads Urine Sample	Clinical Significance
TP53	c.524G > T (p.Arg175Leu)	0%	78%	Pathogenic (LOH)
ERBB2	c.2180G > C (p.Gly727Ala)	0%	28%	Likely pathogenic
RB1	c.2726C > T (p.Thr909Ile)	0%	33%	Uncertain significance
KDM6B	c.1054G > C (p.Glu352Gln)	0%	36%	Uncertain significance
STXB1	c.2917A > C (p.Lys973Gln)	59%	89%	Benign (LOH)
IDUA	c.1127C > T (p.Thr376Ile)	50%	93%	Uncertain significance (LOH)
SMARCA4	c.1554A > C (p.Leu518Phe)	14%	29%	Uncertain significance
	c.2064G > A (p.Lys688=)	0%	38%	Benign
LTBP2	c.4680C > T (p.Asp1560=)	35%	74%	Likely benign (LOH)
NCOR1	c.2502T > C (p.Thr834=)	48%	89%	Benign (LOH)
	c.59A > C (p.Tyr20Ser)	14%	29%	Uncertain significance

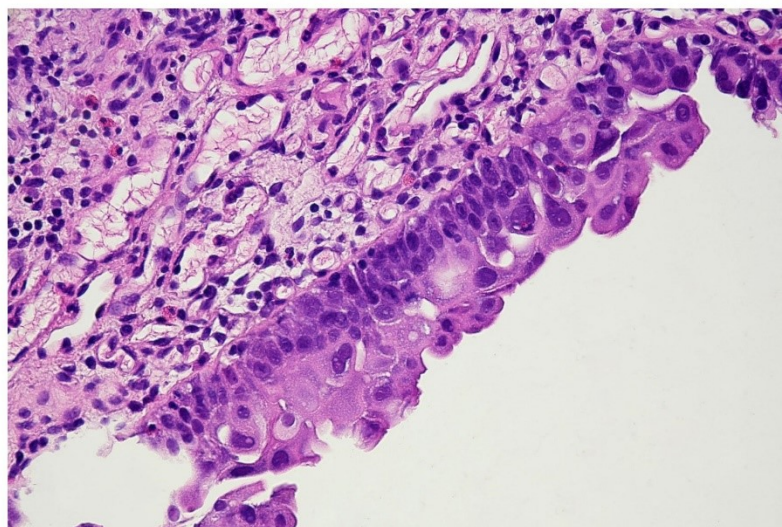
### 3.4. Further Proceeding

With the above-mentioned diagnostic data in hand, cystoscopy was carried out, undertaking a non-random bladder mucosa biopsy. Four specimens were collected, identifying urothelial carcinoma (HG CIS ICD-O code 8120/2) in each localisation and cystitis cystica, which could be responsible for the change seen in TRUS (see Figures 6 and 7).

It was decided to apply local immunotherapy with intravesical injections of attenuated mycobacteria (bacillus Calmette-Guérin—BCG-Medac, medac GmbH, Wedel, Germany). At the moment, the patient is undergoing the maintenance immunotherapy, according to the scheme proposed by Lamm et al. [14]. Demonstrating no disease-related symptoms, the patient returned to work, while remaining under further medical follow-up with the periodical application of non-invasive diagnostic tests. Since the application of treatment, the patient has not presented either LUTS or any other of the previously identified symptoms.

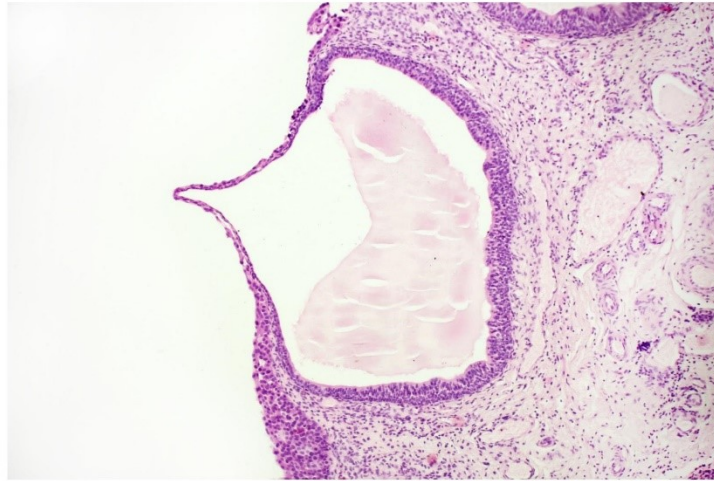
### 3.5. Non-Invasive Monitoring

The European Association of Urology recommends base follow-up of TaT1 tumours and carcinoma in situ (CIS) via regular cystoscopy [15]. In the presented case, the patient agreed to simultaneous non-invasive monitoring with urine cytology (see Figure 8) and the Bladder EpiCheck test (see Table 3). The above-mentioned results were consistent with the invasive monitoring, based on blue light cystoscopies, with histopathological assessment (see Figure 9), as well as with the clinical picture.

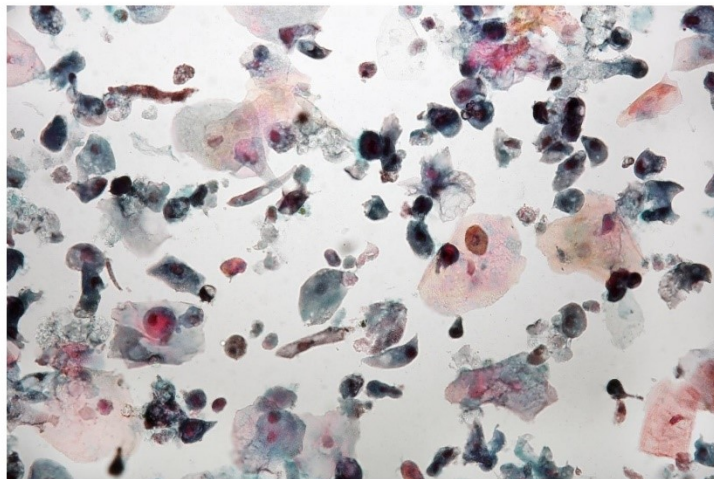


**Figure 6.** Histopathological specimen—Haematoxylin and Eosin (H&E) staining. The bladder is covered with the epithelium, the cells of which show features of severe atypia. Atypical cells are visible in all the layers of the epithelium, including the external surface. Locally, a reduced number of cell layers can be seen. Nuclei are present with marked anisokaryosis, hyperchromasia, and sometimes, with irregularity of the nuclear membrane. The unbroken basement membrane is visible along the entire length of the epithelium; there is no invasion of atypical cells. Occasionally, mitoses with atypical division figures can be noted.





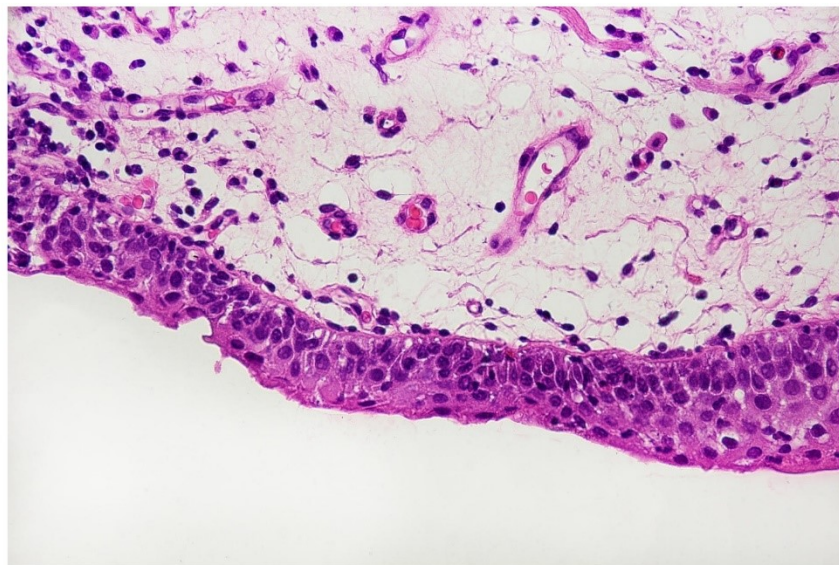
**Figure 7.** Histopathological specimen—Haematoxylin and Eosin (H&E) staining. Cystitis cystica. The cysts are filled with homogeneous eosinophilic fluid and lined with the urothelial epithelium, the cells of which do not show signs of atypia. The atypia is visible in the epithelium, lying on the surface of the bladder in the immediate vicinity of the described cystic structures, in the submucosa of the bladder. There is no crawling of the atypical epithelium into these cysts.



**Figure 8.** Urine sediment—a cytological specimen. Papanicolaou staining. Atypical cells with high N/C ratios (~5% of cells with N/C ratio  $\geq 0.7$  and ~12% with N/C ratio  $\geq 0.5$  and  $<0.7$ ) are visible. A significant amount of normal urothelial cells are visible. There are a few multinucleated cells, granulocytes and uric acid crystals. Significant vacuolisation of the cellular cytoplasm may indicate a strong regenerative reaction. The AUC (atypical urothelial cells) result was stated, based on The Paris System for Reporting Urinary Cytology.

**Table 3.** Results of monitoring with the Bladder EpiCheck test. The follow-up tests began after the initial six doses of BCG treatment.

Primary Result	Follow-Up Result after 3 Months	Follow-Up Result after 6 Months	Follow-Up Result after 12 Months
Positive, EpiScore: 92	Negative, EpiScore: 21	Negative, EpiScore: 17	Negative, EpiScore: 7



**Figure 9.** Histopathological specimen—Haematoxylin and Eosin (H&E) staining. The bladder mucosa with signs of hyperaemia and numerous thin-walled blood vessels are visible. Moderately severe inflammatory infiltrations are present with monoclonal leukocytes. The section is covered with a metaplastic epithelium with the appearance of a flat epithelium. The number of layers of the epithelium is reduced, the cells show no signs of atypia.

#### 4. Discussion

In the presented case, the rather misfortunate circumstance of a 5-year long diagnostic process was mainly caused by the lack of easily accessible urinary cytology and the concomitance of two medical conditions. The LUTS, that can barely occur as a bladder cancer manifestation, prompted the diagnostic process towards isolated benign prostate hyperplasia. It is worth noting that the patient did not present erythrocyturia, a typical bladder cancer symptom. The white light cystoscopy could not reveal the carcinoma in situ within the bladder mucosa, which follows from the tumour morphology. It is reflected by a low sensitivity of this technique in that clinical condition [16]. In the described case, the test that finally led to biopsy of the bladder was urinary cytology that revealed a high-grade urothelial carcinoma. The reason for a simultaneous extension of the diagnostics with Cy-tourofish(+) resulted from our long-term experience with the application of the UroVysion® test [17]. The FISH technique, as well as immunocytochemistry, supported the initial diagnosis. The remaining tests were performed for cognitive, not diagnostic purposes.

A comparative analysis of blood and urine DNA samples, performed with whole-genome sequencing, enabled to presentation of the genomic status of the tumour with multiple changes, which could potentially lead to a more accurate classification of the

disease and reveal possible alternative therapeutic options. It should be emphasised that the isolation of DNA from urine is technically easier and results in better DNA quality than the commonly used FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) samples (our experience, data not published). It should be taken under consideration in the process of implementation of genomics sequencing into clinical practice. During the analysis we were able to recognise several single nucleotide variants, including a pathogenic variant of *TP53* gene that may have contributed to the cancer formation. *ERBB2* mutations are known to be present in bladder cancer and could be potentially used for precision medicine purposes. They are not mutually exclusive of gene amplification [18]. The patient was successfully treated with injections of attenuated mycobacteria, as described above, however, the whole genome sequencing, that enabled recognition of the amplification of *ERBB2* gene, potentially entitles therapy with trastuzumab, lapatinib and many more target-oriented therapies, according to mycancergenome.org. Taking into consideration the missense *ERBB2* mutation present in the specific population of cells in urine sediment, the relevance of amplification should be confirmed, for example, by fluorescence in situ hybridisation with the use of an HER2/neu molecular probe. While the above-mentioned therapy is not popular in bladder cancer cases (three phase 2 clinical trials opened on the date of the manuscript edition), we could not claim that the patient would not receive any benefits from it. The crucial role of *RB1* gene in oncogenesis is commonly known [19]. However, the significance of variants, recognised in the presented case, still remains to be determined.

Weinstein et al. [20] proposed a novel bladder cancer classification based on the molecular events in the tumour DNA. Three groups (A, B and C) are described in the following way: Group A—the amplifications of *E2F2/SOX4*, *EGFR*, *PPARG*, *PVRL4*, *YWHAZ*, *MYC* and the mutations of *MLL2* gene; Group B—the deletion of *CDKN2A* and the activating mutations of *FGFR3*; Group C—*TP53* and *RB1* mutations, the amplifications of *E2F3* and *CCNE1*. Despite the fact that some elements, which form each of the above-mentioned groups, were present in the evaluated material, we could make an attempt to qualify the patient to Group C, while both the point mutations and amplifications were present in the DNA from urine sediments. The analysis of genetic events also enabled the reconstruction of the biological pathways of the tumour development. Relying on our findings, we could recognise disruptions in the *TP53*/*RB1* pathway, as well as disturbances in chromatin remodelling. Some elements of the *RTK*/*RAS*/*PI(3)K* pathway were also altered. The recognition of *TP53* mutation and thus belonging to group C resulted in very probable resistance to a cisplatin-based chemotherapy [21], which may be a crucial information for future personalisation of patient therapy. A complete characterisation of molecular events in the presented case can be found in Appendix D.

The invasive procedure of cystoscopy with histopathological evaluation confirmed the initial diagnosis and enabled the introduction of an effective treatment. While the benefits and limitations of monitoring the high-grade urothelial tumours with cystoscopy and cytology are commonly recognised [15], it was possible in the presented case to use the Bladder EpiCheck test. The test was done before and in the course of the therapy. The obtained results were consistent with the invasive monitoring, based on cystoscopies, as well as with the clinical picture. The presented case provides further evidence for the relevancy of the monitoring schedule, based on switching between cystoscopy and the Bladder EpiCheck test, as proposed by the Radboud University Medical Center [22].

The new epoch of personalised medicine has been creating new demands for diagnostic processes. It is hard to tell if the performed actions were optimal for the patient in the presented case report. Nevertheless, the amount of facts gained from the non-invasive urine tests emphasises their usefulness and may contribute to future diagnostic protocols and therapeutic scenarios. Especially their susceptibility to machine learning algorithms opens a wide range of potentially effective clinical applications.

**Author Contributions:** T.K.—manuscript writing, bioinformatic analysis, data visualisation; G.K.P.—the analysis of whole-genome sequencing results; M.B.—laboratory work, regarding the Bladder EpiCheck; S.G.—the pathomorphological assessment at diagnosis; M.G.—the bioinformatic analysis;



A.J.—the urological consulting and patient treatment; Ł.K.—clinical consulting; I.K.—laboratory work, regarding DNA isolation; optimisation of DNA isolation process from urine sediment and FFPE samples; D.K.—clinical documentation handling; A.M.—laboratory work, regarding FISH and IHC studies; M.O.—laboratory work, regarding cytology assessment; M.R.—cystoscopic examination; J.S. (Jordan Salamunia)—laboratory work of DNA isolation; D.S.—laboratory processing of FISH tests; J.S. (Jarosław Szwalowski) has contributed to pathomorphological assessment after treatment; B.K. has conceptualised and supervised the manuscript. All the authors have read and approved the edited version of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The reported study was financially supported by EU funds from the Regional Operational Program: RPLD.01.02.01-10-0018/19 and RPLD.01.02.02-10-0130/19.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The type and scope of the study does not require Ethics Committee approval.

**Informed Consent Statement:** Written informed consent has been obtained from the patient to publish this paper.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The Trading Division of the “Genos” Partnership is the exclusive distributor of the Bladder EpiCheck test on the territory of Poland.

## Appendix A FISH Procedure

### Appendix A.1 Sample Collection and Slides Preparation

1. Sample collection: 700 mL of fresh urine, placed in a 50 mL tip centrifuge tube and centrifuged at room temperature with 2000 rpm for 10 min.
2. Cell harvest: The supernatant was carefully discarded, leaving a few milliliters.
3. Step 1 and 2 were repeated until the entire delivered urine sample was concentrated.
4. The cytospin technique was used to perform a thin-layer cytological preparation.
5. The slide was fixed in 95% ethyl alcohol (POCH; Gliwice; Poland).

### Appendix A.2 Slide Processing

1. The slide was soaked for 2 min in the  $2 \times$  SSC buffer (Abbott; Wiesbaden; Germany) at 73 °C.
2. The slide was incubated for 10 min in pepsin solution (Pan Path; Budel; The Netherlands) at 37 °C.
3. The slide was washed for  $1 \times 5$  min in PBS (Biological Industries; Kibbutz Beit Haemek; Israel).
4. The slide was washed for  $1 \times 5$  min in 1% formaldehyde (POL-AURA; Olsztyn; Poland) at room temperature.
5. The slide was washed for  $1 \times 5$  min in PBS at room temperature.
6. The slide was dehydrated in gradient alcohol (70%, 85%, 100%) for 1 min each.
7. The slide was allowed to air dry.

### Appendix A.3 Denaturation and Hybridisation

The following operations were performed at a darkroom.

1. The probe was taken out from a freezer and placed at room temperature for 5 min.
2. The probe was mixed and briefly centrifuged.
3. 5 µL of the probe was taken and dropped onto the slide, which immediately was covered with a  $22 \times 22$  mm coverslip (Knittel Glass; Braunschweig; Germany), avoiding air bubbles.
4. The slide was placed in a hybridiser: denaturation at 80 °C for 10 min; hybridisation at 37 °C for 24 h.

*Appendix A.4 Posthybridisation Washes*

The following operations were performed at a darkroom.

1. The slide was immersed in 2xSSC/0.3% NP-40 buffer (Pan Path; Budel; Netherlands) for about 5 s to gently remove the cover slide.
2. The slide was placed in a Coplin jar with 2xSSC/0.3% NP-40 buffer in a 72 °C water bath for 2 min.
3. The slide was washed again in 2xSSC/0.1% NP-40 buffer at room temperature for 1 min.

*Appendix A.5 Counterstaining*

The following operations were performed at a darkroom.

1. 10 µL of Mounting Medium Fluorescence with DAPI (Pan Path; Budel; the Netherlands) was placed on a dry glass slide and immediately covered and sealed with nail polish.
2. The slide was stored at 4 °C in the dark for 1 day and then was analysed.

**Appendix B Immunocytochemical Procedure***Appendix B.1 Sample Collection and Slide Preparation*

1. Sample collection: 700 mL of fresh urine was placed in a 50 mL tip centrifuge tube and centrifuged at room temperature with 2000 rpm for 10 min.
2. Cell harvest: The supernatant was carefully discarded, leaving a few milliliters.
3. Step a and b were repeated until the entire delivered urine sample was concentrated.
4. The cytospin technique was used to obtain a thin-layer cytological preparation.
5. The slide was fixed in 95% ethyl alcohol (POCH; Gliwice; Poland).

*Appendix B.2 IHC Procedure*

1. Formalin (POL-AURA; Olsztyn; Poland) fixation at room temperature for 15 min.
2. Block endogenous peroxidase by incubating the slide with 3% hydrogen peroxide (POCH; Gliwice; Poland) at room temperature for 5 min.
3. It was rinsed in tap water for 5 min.
4. The antigen was retrieved by incubating the slide in TRS buffer (Leica; Wetzlar; Germany) and preheated to 99 °C in water bath for 40 min.
5. The slide was cooled in tap water.
6. The slide was washed for 1 × 5 min in TBS buffer (Mar-Four; Konstantynow Lodzki; Poland).
7. In order to minimise false-positive staining, the slide was preincubated with Normal Goat Antibody (Vector Laboratories; Burlingame; United States) at room temperature for 20 min at a moist chamber.
8. The excess of Normal Goat Antibody was shaken off.
9. The primary antibody was added (GenomeMe; Geel; Belgium) and the slide was incubated at a moist chamber for 30 min.
10. The slide was washed for 1 × 5 min in TBS buffer.
11. The secondary antibody (GenomeMe; Geel; Belgium) was added and the slide was incubated at the moist chamber for 30 min.
12. The slide was washed for 1 × 5 min in TBS buffer.
13. A substrate—DAB (Vector Laboratories; Burlingame; United States) was added and the slide was incubated at the moist chamber for 5 min.
14. It was then rinsed in tap water for 2 min.
15. Haematoxylin (Sigma-Aldrich; Missouri; United States) staining was carried out for 5 to 10 min.
16. The slide was dehydrated in gradient alcohol (70%, 80%, 100%) for 5 s each.
17. A coverslip with Entellan (Merck; Darmstadt; Germany) was used.

## Appendix C

Table A1. A complete list of manually analysed genes.

Gene	Localisation hg19	Reference Sequence	Variant
TP53	chr17:7,578,406	NM_001126114.2	c.524G > T (p.Arg175Leu)
KDM6B	chr17:7,752,523	NM_001080424.2	c.2917A > C (p.Lys973Gln)
FGFR3	-	-	-
RXRA	-	-	-
ERBB2	chr17:37,879,885	NM_001382805.1	c.2180G > C (p.Gly727Ala)
HRAS	-	-	-
RB1	chr13:49,054,146	NM_000321.3	c.2726C > T (p.Thr909Ile)
CDKN2A	chr13:48,942,667	NM_000321.3	c.1054G > C (p.Glu352Gln)
KRAS	-	-	-
IDH1	-	-	-
MLL2 (KMT2D)	-	-	-
MDM2	-	-	-
CCND1	-	-	-
CCNE1	-	-	-
E2F3	-	-	-
SETD2	-	-	-
KDM6A	-	-	-
CREBBP	-	-	-
EP300	-	-	-
ARID1A	-	-	-
ARID1B	-	-	-
EGFR	-	-	-
ERBB3	-	-	-
PIK3CA	-	-	-
NRAS	-	-	-
NF1	-	-	-
TSC1	-	-	-
TSC2	-	-	-
PTEN	-	-	-
AKT3	-	-	-
STAG2	-	-	-
ERCC2	-	-	-
NFE2L2	-	-	-
TXNIP	-	-	-
RHOA	-	-	-
RHOB	-	-	-
TERT	-	-	-
SMARCA2	-	-	-
SMARCA4	chr19:11,118,640	NM_001128849.3	c.2064G > A (p.Lys688=)
SMARCC1	chr19:11,169,514	NM_001128849.3	c.4680C > T (p.Asp1560=)
SMARCC2	-	-	-
PPARG	-	-	-
NECTIN4	-	-	-
MYC	-	-	-
YWHAZ	-	-	-
GATA3	-	-	-
FOXA1	-	-	-
UPK3A	-	-	-
KRT14	-	-	-
KRT5	-	-	-
KRT6A	-	-	-
BRAF	-	-	-
RYR1	-	-	-

Table A1. Cont.

Gene	Localisation hg19	Reference Sequence	Variant
STXBP1	chr9:130,438,099	NM_003165.6	c.1127C > T (p.Thr376Ile)
CSRP1	-	-	-
SLC26A4	-	-	-
MTOR	-	-	-
FBN1	-	-	-
PEX7	-	-	-
FANCA	-	-	-
B9D2	-	-	-
LAMA3	-	-	-
LTBP2	chr14:74,991,855	NM_000428.3	c.2502T > C (p.Thr834=)
LARS2	-	-	-
FGFR2	-	-	-
RP1	-	-	-
IDUA	chr4:997,162	NM_000203.5	c.1554A > C (p.Leu518Phe)
CDKN1A	-	-	-
FBXW7	-	-	-
ELF3	-	-	-
KLF5	-	-	-
FOXQ1	-	-	-
PAIP1	-	-	-
BTG2	-	-	-
ZFP36L1	-	-	-
CCND3	-	-	-
NCOR1	chr17:16,097,825	NM_006311.4	c.59A > C (p.Tyr20Ser)
YAP1	-	-	-
ZNF703	-	-	-
MYCL	-	-	-
MLL (KMT2A)	-	-	-
MLL3 (KMT2C)	-	-	-
MLL4 (KMT2B)	-	-	-
BCL2L1	-	-	-

## Appendix D

Table A2. A complete list of manually analysed genes (an adaptation from Young Seok Ju [13]—modified).

Frequently Altered Genes and Pathways in Bladder Cancer					
Pathway	Occurrence	Gene	Mechanism	Frequency	Presence
TP53/RB1 pathway	>90%	TP53	Inactivating mutations, deletion	>50%	Yes
		CKDN2A	Deletion	~50%	Yes
		RB1	Inactivating mutations, deletion	~10%	Effect of detected RB1 mutation is unknown
		MDM2	Amplification	~10%	Yes
		CCND1	Amplification	~10%	Yes
		CCNE1	Amplification	~10%	Yes
Chromatin remodelling	>90%	E2F3	Amplification	~20%	Yes
		MLL/MLL2/MLL3/MLL4	Inactivating mutations, deletion	>30%	-
		SETD2	Inactivating mutations, deletion	~10%	-
		KDM6A/KDM6B	Inactivating mutations, deletion	>30%	Yes
		CREBBP	Inactivating mutations, deletion	>10%	Yes
		EP300	Inactivating mutations, deletion	>10%	Yes
		ARID1A/ARID1B	Inactivating mutations, deletion	>30%	Yes
		SMARCA2/SMARCA4	Inactivating mutations, deletion	>20%	Yes

Table A2. Cont.

Frequently Altered Genes and Pathways in Bladder Cancer					
Pathway	Occurrence	Gene	Mechanism	Frequency	Presence
RTK/RAS/PI(3)K pathway	>70%	SMARCC1/SMARCC2	Inactivating mutations, deletion	>20%	-
		FGFR3	Activating mutations, gene fusions, amplification	~15%	Yes
		EGFR	Amplification	~10%	-
		ERBB2	Activating mutations, gene fusions, amplification	~10%	Yes
		ERBB3	Activating mutations	~10%	-
		PIK3CA	Activating mutations, Amplification	>10%	Yes
		NRAS/HRAS/KRAS	Activating mutations	~10%	-
		NF1	Inactivating mutations	~5%	-
		TSC1/TSC2	Inactivating mutations, deletion	~10%	Yes
		PTEN	Inactivating mutations, deletion	~10%	-
Miscellaneous	N/A	AKT3	Overexpression	10%	-
		STAG2	Inactivating mutations, large deletion, hypermethylation	>10%	-
		ERCC2	Inactivating missense mutation	~10%	-
		RXRA	Activating mutations	~10%	-
		NFE2L2	Inactivating missense mutation	~10%	-
		TXNIP	Inactivating mutations	~7%	-
		RHOA/RHOB	Missense mutation	~10%	-

Table A3. Molecular classification of bladder cancer (adaptation from Young Seok Ju [13]—modified).

Description	Characteristic in Details	Pathology	Presence
Focally amplified	Focal somatic amplifications (E2F2/SOX4, EGFR, PPARG, PVRL4, YWHAZ, MYC) and MLL2 mutations	-	Average probability
CDKN2A-deficient FGFR3 mutant	Copy number loss of CDKN2A, activating mutations of FGFR3	Enriched in papillary histology	Average probability
TP53/cell-cycle mutant	TP53 mutations, RB1 mutations, amplifications of E2F3 and CCNE1	-	High probability

## References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
- Wojciechowska, U.; Didkowska, J.; Michalek, I.; Olasek, P.; Ciuba, A. Nowotwory Złośliwe w Polsce w 2018 Roku | Cancer in Poland. In *Nowotwory złośliwe w Polsce w ... roku*; Narodowy Instytut Onkologii: Warsaw, Poland, 2019; ISSN 0867-8251.
- Bosetti, C.; Bertuccio, P.; Chatenoud, L.; Negri, E.; La Vecchia, C.; Levi, F. Trends in Mortality from Urologic Cancers in Europe, 1970–2008. *Eur. Urol.* **2011**, *60*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rosenthal, D.L.; Wojcik, E.M.; Kurtycz, D.F.I. (Eds.) *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; ISBN 978-3-319-22863-1.
- Mancini, M.; Righetto, M.; Zumerle, S.; Montopoli, M.; Zattoni, F. The Bladder EpiCheck Test as a Non-Invasive Tool Based on the Identification of DNA Methylation in Bladder Cancer Cells in the Urine: A Review of Published Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6542. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Winckler, W.; Guttman, M.; Lander, E.S.; Getz, G.; Mesirov, J.P. Integrative Genomics Viewer. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 24–26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Koboldt, D.C.; Chen, K.; Wylie, T.; Larson, D.E.; McLellan, M.D.; Mardis, E.R.; Weinstock, G.M.; Wilson, R.K.; Ding, L. VarScan: Variant Detection in Massively Parallel Sequencing of Individual and Pooled Samples. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2009**, *25*, 2283–2285. [\[CrossRef\]](#)



8. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup the Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinform. Oxf. Engl.* **2009**, *25*, 2078–2079. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Rausch, T.; Zichner, T.; Schlattl, A.; Stütz, A.M.; Benes, V.; Korbel, J.O. DELLY: Structural Variant Discovery by Integrated Paired-End and Split-Read Analysis. *Bioinformatics* **2012**, *28*, i333–i339. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Ramirez, F.; Ryan, D.P.; Grünig, B.; Bhardwaj, V.; Kilpert, F.; Richter, A.S.; Heyne, S.; Dündar, F.; Manke, T. DeepTools2: A next Generation Web Server for Deep-Sequencing Data Analysis. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W160–W165. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Krzywinski, M.; Schein, J.; Birol, I.; Connors, J.; Gascoyne, R.; Horsman, D.; Jones, S.J.; Marra, M.A. Circos: An Information Aesthetic for Comparative Genomics. *Genome Res.* **2009**, *19*, 1639–1645. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Clark, P.E. Bladder Cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2007**, *19*, 241–247. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Seok Ju, Y. The Mutational Signatures and Molecular Alterations of Bladder Cancer. *Transl. Cancer Res.* **2017**, *6*, S689–S701. [\[CrossRef\]](#)
14. Lamm, D.L.; Blumenstein, B.A.; Crissman, J.D.; Montie, J.E.; Gottesman, J.E.; Lowe, B.A.; Sarosdy, M.F.; Bohl, R.D.; Grossman, H.B.; Beck, T.M.; et al. Maintenance Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Recurrent TA, T1 and Carcinoma in Situ Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: A Randomized Southwest Oncology Group Study. *J. Urol.* **2000**, *163*, 1124–1129. [\[CrossRef\]](#)
15. Babjuk, M.; Burger, M.; Compérat, E.M.; Gontero, P.; Mostafid, A.H.; Palou, J.; van Rhijn, B.W.G.; Roupřet, M.; Shariat, S.F.; Sylvester, R.; et al. European Association of Urology Guidelines on Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ)—2019 Update. *Eur. Urol.* **2019**, *76*, 639–657. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Daneshmand, S.; Bazargani, S.T.; Bivalacqua, T.J.; Holzbeierlein, J.M.; Willard, B.; Taylor, J.M.; Liao, J.C.; Pohar, K.; Tierney, J.; Konety, B.; et al. Blue Light Cystoscopy for the Diagnosis of Bladder Cancer: Results from the US Prospective Multicenter Registry. *Urol. Oncol.* **2018**, *36*, 361.e1–361.e6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Kaluzewski, T.; Morzuch, L.; Jedrzejczyk, A.; Marks, P.; Rozniecki, M.; Bednarek, M. Advantages of Fluorescence in Situ Hybridisation Technique in Urothelial Carcinogenesis Identification. Retrospective Evaluation of 512 Urovysion Test Results. *MEDtube Sci.* **2018**, *7*, 8–13.
18. Cousin, S.; Khalifa, E.; Crombe, A.; Laizet, Y.; Lucchesi, C.; Toulmonde, M.; Le Moulec, S.; Auzanneau, C.; Soubeyran, I.; Italiano, A. Targeting ERBB2 Mutations in Solid Tumors: Biological and Clinical Implications. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Murphree, A.L.; Benedict, W.F. Retinoblastoma: Clues to Human Oncogenesis. *Science* **1984**, *223*, 1028–1033. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Weinstein, J.N.; Akbani, R.; Broom, B.M.; Wang, W.; Verhaak, R.G.W.; McConkey, D.; Lerner, S.; Morgan, M.; Creighton, C.J.; Smith, C.; et al. Comprehensive Molecular Characterization of Urothelial Bladder Carcinoma. *Nature* **2014**, *507*, 315–322. [\[CrossRef\]](#)
21. Choi, W.; Porten, S.; Kim, S.; Willis, D.; Plimack, E.R.; Hoffman-Censits, J.; Roth, B.; Cheng, T.; Tran, M.; Lee, I.-L.; et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 152–165. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Witjes, J.A.; Morote, J.; Cornel, E.B.; Gakis, G.; van Valenberg, F.J.P.; Lozano, F.; Sternberg, I.A.; Willemsen, E.; Hegemann, M.L.; Paitan, Y.; et al. Performance of the Bladder EpiCheck™ Methylation Test for Patients Under Surveillance for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Results of a Multicenter, Prospective, Blinded Clinical Trial. *Eur. Urol. Oncol.* **2018**, *1*, 307–313. [\[CrossRef\]](#)

## 12. Kopia publikacji drugiej

MEDYCYNĄ SPERSONALIZOWANĄ 2022

**Tadeusz Kałużewski<sup>1,2</sup>, Iza Kubiak<sup>1</sup>, Łukasz Kępczyński<sup>1,2</sup>, Adam Jędrzejczyk<sup>3</sup>, Marek Roźniecki<sup>4</sup>, Agnieszka Gach<sup>2</sup>, Bogdan Kałużewski<sup>1</sup>**

1. Laboratorium Genetyki Medycznej "Genos" – dział R&D, Łódź, Polska
2. Zakład Genetyki, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polski, Łódź, Polska
3. Oddział Urologii, Szpital Powiatowy w Radomsku, Radomsko, Polska
4. Lekarze Urologów Marek Roźniecki i Partnerzy, Niepubliczny Oddział Urologii, Łask, Polska

### **MUTACJE PROMOTORA GENU *TERT* JAKO MARKERY MOLEKULARNE STANÓW PRZEDNOWOTWOROWYCH RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO. PRZEGLĄD LITERATURY ORAZ OPIS PRZYPADKU**

#### Wstęp

Prawidłowe komórki budujące organizmy złożone w tym komórki ludzkie posiadają ściśle określony limit podziałów w ciągu swojego życia (limit Hayflicka) [1]. Limit ten jest różny w zależności od stopnia zróżnicowania danej populacji komórek. W sytuacji prawidłowej limit Hayflicka nie występuje jedynie w przypadku komórek macierzystych. Programowana śmierć komórki w drodze apoptozy następująca po osiągnięciu limitu podziałów jest naturalną ochroną przed nowotworzeniem [2]. Osiągnięcie nieśmiertelności jest zatem warunkiem krytycznym dla rozwoju nowotworów oraz cechą niezbędną do uzyskania złośliwości. Oporność na mechanizmy programowanej śmierci komórki jest jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych (hallmarks of cancer) [3]. Najczęściej występującym mechanizmem przyczyniającym się do nieśmiertelnienia jest nadmierna aktywacja enzymu telomerazy [4].

#### **Rola telomerazy oraz genu *TERT* w procesie kancerogenezy**

Telomery są tandemowymi powtórzeniami sekwencji TTAGGG (u kręgowców) połączonymi z szeregiem wyspecjalizowanych białek warunkujących ich stabilność i odpowiedni kształt, które chronią końce chromosomów przed naturalną erozją występującą w trakcie replikacji [5]. Skracanie telomerów po każdym podziale przybliża komórkę do momentu, w którym uszkodzeniu ulegać będą kodujące fragmenty DNA co nieuchronnie prowadzi do śmierci komórkowej [6]. Głównym mechanizmem umożliwiającym wydłużenie telomerów oraz ich uzupełnianie jest aktywność enzymu telomerazy. Telomeraza jest

enzymem rybonukleoproteinowym składającym się z podjednostki TERT (ang. Telomerase Reverse Transcriptase) o aktywności odwrotnej transkryptazy, wewnętrznej matrycy RNA – TERC (ang. telomerase RNA component) oraz dyskeriny (białka stabilizującego). U ludzi telomeraza ulega ekspresji w embrionalnych komórkach macierzystych, a następnie jest wyciszana w komórkach somatycznych podczas procesu różnicowania [7]. Telomeraza jest wykrywalna w ponad 90% ludzkich nowotworów, a jej nadaktywność jest uważana za najczęstszą drogę prowadzącą do nieśmiertelności komórek [7][8]. Wykazano, że zwiększona ekspresja produktów genu *TERT*, kodującego podjednostkę TERT prowadzi do przywrócenia aktywności telomerazy [9]. Zwiększona ekspresja genu *TERT* w nowotworach może być spowodowana wieloma mechanizmami m.in. amplifikacją, rearanżacjami w obrębie genu czy mutacjami promotora. Amplifikacje oraz rearanżacje występują stosunkowo rzadko (łącznie około 4% nowotworów złośliwych) jednakże są specyficzne dla konkretnych podtypów nowotworów co w praktyce przekłada się na możliwość doprecyzowania rozpoznania histopatologicznego [10]. Znacznie częstszym mechanizmem są mutacje w obrębie promotora *TERT*, w szczególności transycje C>T w lokalizacji chr5:1295228 (-124 lub C228T) oraz chr5:1295250 (-146 lub C250T) (hg19/GCRh37) [4].

#### **Mutacje promotora genu *TERT* w raku pęcherza moczowego**

Mutacje promotora genu *TERT* są najczęstszymi zaburzeniami genetycznymi wykrywanymi w próbce DNA wyizolowanego z tkanki nowotworowej w przypadkach raka pęcherza moczowego [11][12]. Swoją częstością znacząco przekraczają dotychczasowo uważane za najczęstsze mutacje punktowe w genie *TP53* [13]. Występują niezależnie od typu histopatologicznego oraz stanu klinicznego [11]. W badaniach Allory Y. i wsp. potwierdzono obecność mutacji promotora genu *TERT* w 73% raków typu NMIBC (Non Muscle Invasive Bladder Cancer) o niskim stopniu złośliwości (TaG1 i TaG2), w 74% raków typu MIBC o wysokim stopniu złośliwości (TaG3, Tis, T1G2, T1G3) oraz w 53% raków typu MIBC (muscle invasive bladder cancer) na liczbie 111 pacjentów. Najczęstsza mutacja C228T stanowiła 83,3%, a mutacja C250T wystąpiła w 12,8% przypadków. Pozostałe 3,9% stanowiły mutacje C242T, C243T oraz C228A, które wykryto w pojedynczych przypadkach. Analizy przeprowadzone na tej grupie pacjentów wykonano z zastosowaniem techniki sekwencjonowania Sanger. W tym samym badaniu wykonano analizę kolejnych 357 pacjentów z zastosowaniem techniki SNaPshot – mutację promotora *TERT* wykryto w 80%

przypadkach raków NIMBC oraz 79% MIBC [11]. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia o możliwym znaczeniu mutacji promotora *TERT* w patogenezie raka pęcherza moczowego [14][15]. W celu ustalenia momentu pojawienia się mutacji w trakcie kancerogenezy niezbędne są badania prospektywne na pacjentach bezobjawowych. Tego typu badania udało się przeprowadzić Hosen i wsp., którzy wykorzystując archiwalne DNA izolowane z osadu moczu wykazali obecność mutacji promotora *TERT* u 14 z 30 badanych pacjentów (46,67%), którzy w późniejszym okresie zachorowali na raka pęcherza moczowego. Szczególnie interesujący jest fakt, że mutacje zostały wykryte w próbkach uzyskanych nawet 10 lat przed diagnozą kliniczną. Należy również zaznaczyć, że do badania dołączono 101 próbek kontrolnych i w żadnej nie wykryto mutacji promotora *TERT*, co przekłada się na 100% specyficzność tych mutacji dla raka pęcherza moczowego w materiale pozyskanym z próbki moczu [16].

### Opis przypadku

W 2018 roku do Poradni Genetycznej Genos zgłosił się 66 letni pacjent, z objawami chorobowymi z dolnego odcinka dróg moczowych (LUTS - Lower Urinary Tract Symptoms) nie ustępującymi po 5 letnim procesie diagnostyczno-terapeutycznym. Proces obejmował badania rutynowe wraz z cystoskopią, leczenie przeciwnieinfekcyjne oraz łagodzenie objawów związanych z łagodnym rozrostem gruczołu krokowego. W efekcie zastosowania nieinwazyjnych metod diagnostycznych w naszym Laboratorium postawiono rozpoznanie wstępne, a następnie, po wykonaniu biopsji ściany pęcherza moczowego, rozpoznanie ostateczne *carcinoma in situ*. Diagnostykę rozszerzono o badanie DNA wyizolowanego z osadu moczu oraz krwi pacjenta metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS – next generation sequencing) wykrywając nowe mutacje w genach *TP53* oraz *RBI* potencjalnie związane z patogenezą choroby, które opublikowano [17]. W retrospektywnej analizie danych pochodzących z sekwencjonowania NGS wykryto mutację C250T w promotorze genu *TERT* w 14/22 odczytów pochodzących z próbki DNA osadu moczu oraz 0/9 w próbce DNA pochodzącej z krwi obwodowej pacjenta. Biorąc pod uwagę trudności związane z diagnostyką *carcinoma in situ* pęcherza moczowego, w tym niską czułość cystoskopii w przypadkach tego nowotworu (55%) [18] uzasadnionym wydaje się postawienie pytania: czy wykonanie relatywnie taniego oznaczenia mutacji promotora *TERT* na początku procesu diagnostycznego znacząco nie przyspieszyłoby momentu ustalenia rozpoznania?

## Podsumowanie

Mutacje w obrębie promotora genu *TERT* są najczęstszymi somatycznymi mutacjami w przypadkach raka pęcherza moczowego. Występują bez względu na typ histopatologiczny czy stopień zaawansowania choroby, a ich obecność może być wykryta na wiele lat przed wystąpieniem objawów klinicznych. Łatwy dostęp do materiału jakim jest DNA izolowane z osadu moczu oraz szeroki zakres technik laboratoryjnych umożliwiających diagnostykę budzą nadzieje na szerokie wykorzystanie mutacji promotora genu *TERT* jako markera przesiewowego stosowanego w grupach podwyższonego ryzyka zachorowania na raka pęcherza moczowego.

Podziękowania: niniejsza publikacja powstała dzięki wsparciu z środków europejskich w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Łódzkiego na lata 2014-2020 (projekty RPLD.01.02.01-10-0018/19 oraz RPLD.01.02.02-10-0130/19).

## Piśmiennictwo

1. Hayflick, L.; Moorhead, P.S. The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **1961**, *25*, 585–621, doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6.
2. Adams, J.M.; Cory, S. The Bcl-2 Apoptotic Switch in Cancer Development and Therapy. *Oncogene* **2007**, *26*, 1324–1337, doi:10.1038/sj.onc.1210220.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
4. Colebatch, A.J.; Dobrovic, A.; Cooper, W.A. TERT Gene: Its Function and Dysregulation in Cancer. *J Clin Pathol* **2019**, *72*, 281–284, doi:10.1136/jclinpath-2018-205653.
5. Bonetti, D.; Martina, M.; Falcettoni, M.; Longhese, M.P. Telomere-End Processing: Mechanisms and Regulation. *Chromosoma* **2013**, doi:10.1007/s00412-013-0440-y.
6. Muraki, K.; Nyhan, K.; Han, L.; Murnane, J.P. Mechanisms of Telomere Loss and Their Consequences for Chromosome Instability. *Front Oncol* **2012**, *2*, 135, doi:10.3389/fonc.2012.00135.
7. Kim, N.W.; Piatyszek, M.A.; Prowse, K.R.; Harley, C.B.; West, M.D.; Ho, P.L.; Coviello, G.M.; Wright, W.E.; Weinrich, S.L.; Shay, J.W. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science* **1994**, *266*, 2011–2015, doi:10.1126/science.7605428.

8. Shay, J.W.; Bacchetti, S. A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer. *Eur J Cancer* **1997**, *33*, 787–791, doi:10.1016/S0959-8049(97)00062-2.
9. Counter, C.M.; Meyerson, M.; Eaton, E.N.; Ellisen, L.W.; Caddle, S.D.; Haber, D.A.; Weinberg, R.A. Telomerase Activity Is Restored in Human Cells by Ectopic Expression of HTERT (HST2), the Catalytic Subunit of Telomerase. *Oncogene* **1998**, *16*, 1217–1222, doi:10.1038/sj.onc.1201882.
10. Barthel, F.P.; Wei, W.; Tang, M.; Martinez-Ledesma, E.; Hu, X.; Amin, S.B.; Akdemir, K.C.; Seth, S.; Song, X.; Wang, Q.; et al. Systematic Analysis of Telomere Length and Somatic Alterations in 31 Cancer Types. *Nat Genet* **2017**, *49*, 349–357, doi:10.1038/ng.3781.
11. Allory, Y.; Beukers, W.; Sagrera, A.; Flández, M.; Marqués, M.; Márquez, M.; van der Keur, K.A.; Dyrskjot, L.; Lurkin, I.; Vermeij, M.; et al. Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations in Bladder Cancer: High Frequency across Stages, Detection in Urine, and Lack of Association with Outcome. *Eur Urol* **2014**, *65*, 360–366, doi:10.1016/j.eururo.2013.08.052.
12. Borah, S.; Xi, L.; Zaug, A.J.; Powell, N.M.; Dancik, G.M.; Cohen, S.B.; Costello, J.C.; Theodorescu, D.; Cech, T.R. Cancer. TERT Promoter Mutations and Telomerase Reactivation in Urothelial Cancer. *Science* **2015**, *347*, 1006–1010, doi:10.1126/science.1260200.
13. AACR Project GENIE Consortium AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov* **2017**, *7*, 818–831, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0151.
14. Rachakonda, P.S.; Hosen, I.; de Verdier, P.J.; Fallah, M.; Heidenreich, B.; Ryk, C.; Wiklund, N.P.; Steineck, G.; Schadendorf, D.; Hemminki, K.; et al. TERT Promoter Mutations in Bladder Cancer Affect Patient Survival and Disease Recurrence through Modification by a Common Polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 17426–17431, doi:10.1073/pnas.1310522110.
15. Kinde, I.; Munari, E.; Faraj, S.F.; Hruban, R.H.; Schoenberg, M.; Bivalacqua, T.; Allaf, M.; Springer, S.; Wang, Y.; Diaz, L.A.; et al. TERT Promoter Mutations Occur Early in Urothelial Neoplasia and Are Biomarkers of Early Disease and Disease Recurrence in Urine. *Cancer Res* **2013**, *73*, 7162–7167, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2498.

16. Hosen, M.I.; Sheikh, M.; Zvereva, M.; Scelo, G.; Forey, N.; Durand, G.; Voegelé, C.; Poustchi, H.; Khoshnia, M.; Roshandel, G.; et al. Urinary TERT Promoter Mutations Are Detectable up to 10 Years Prior to Clinical Diagnosis of Bladder Cancer: Evidence from the Golestan Cohort Study. *EBioMedicine* **2020**, *53*, 102643, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102643.
17. Kałużewski, T.; Przybylski, G.K.; Bednarek, M.; Glazar, S.; Grabiec, M.; Jędrzejczyk, A.; Kępczyński, Ł.; Kubiak, I.; Kucharska, D.; Morel, A.; et al. The Usefulness of Cell-Based and Liquid-Based Urine Tests in Clarifying the Diagnosis and Monitoring the Course of Urothelial Carcinoma. Identification of Novel, Potentially Actionable, RB1 and ERBB2 Somatic Mutations. *J Pers Med* **2021**, *11*, doi:10.3390/jpm11050362.
18. Daneshmand, S.; Bazargani, S.T.; Bivalacqua, T.J.; Holzbeierlein, J.M.; Willard, B.; Taylor, J.M.; Liao, J.C.; Pohar, K.; Tierney, J.; Konety, B.; et al. Blue Light Cystoscopy for the Diagnosis of Bladder Cancer: Results from the US Prospective Multicenter Registry. *Urol Oncol* **2018**, *36*, 361.e1-361.e6, doi:10.1016/j.urolonc.2018.04.013.





## Article

# Report on the Effect of the Implementation of an Early Detection and Prevention of Cancer Program on Families at High Hereditary Risk—Concentrating on Patients Undergoing Genetic Diagnostics and Counseling in Central Poland

Tadeusz Kałużewski <sup>1,\*</sup>, Izabela Kubiak <sup>2,3</sup>, Michał Bednarek <sup>2</sup>, Jordan Salamunia <sup>2</sup>, Dorota Kucharska <sup>2,3</sup>, Łukasz Kępczyński <sup>1</sup>, Marek Stempień <sup>4</sup>, Tobiasz Kubicki <sup>5</sup>, Radziław Trzciński <sup>4,6</sup>, Zofia Gordon-Sönmez <sup>7</sup>, Anna Bartosińska-Dyc <sup>7</sup>, Agnieszka Gach <sup>1</sup> and Bogdan Kałużewski <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, 93-338 Lodz, Poland; lukasz.kepczynski@iczm.edu.pl (L.K.)

<sup>2</sup> R&D Department, Laboratory of Medical Genetics, GENOS Sp. z o.o., 91-033 Lodz, Poland; b.kaluzewski42@gmail.com (B.K.)

<sup>3</sup> Regional Center for Cancer Prevention, Zdunska Wola District Hospital Sp. z o.o., 98-220 Zdunska Wola, Poland

<sup>4</sup> Department of General and Colorectal Surgery with the Subdepartment of Oncological Surgery, Provincial Hospital John Paul II in Belchatów, 97-400 Belchatow, Poland; trzciniski@wp.pl (R.T.)

<sup>5</sup> Sokrates Medical Center, 98-200 Sieradz, Poland

<sup>6</sup> Institute of Medical Sciences, Collegium Medium of the Jan Kochanowski University in Kielce, 25-369 Kielce, Poland

<sup>7</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Zdunska Wola District Hospital Sp. z o.o., 98-220 Zdunska Wola, Poland

\* Correspondence: tadeusz.kaluzewski@iczm.edu.pl



**Citation:** Kałużewski, T.; Kubiak, I.; Bednarek, M.; Salamunia, J.; Kucharska, D.; Kępczyński, Ł.; Stempień, M.; Kubicki, T.; Trzciński, R.; Gordon-Sönmez, Z.; et al. Report on the Effect of the Implementation of an Early Detection and Prevention of Cancer Program on Families at High Hereditary Risk—Concentrating on Patients Undergoing Genetic Diagnostics and Counseling in Central Poland. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13178. <https://doi.org/10.3390/ijms241713178>

Academic Editors: Bruna Scaggianti and Alvaro Galli

Received: 21 July 2023

Revised: 22 August 2023

Accepted: 22 August 2023

Published: 24 August 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Over a 46-month period, the objectives of the National Cancer Control Program (NCCP, pol. Narodowy Program Zwalczenia Chorób Nowotworowych), coordinated by the Ministry of Health, were pursued by conducting genetic diagnostics on individuals at high risk of developing cancer. A total of 1097 individuals were enrolled in the study, leading to the identification of 128 cases of germline mutations. The implementation of the NCCP led to the identification of genetic mutations in 4.43% of the patients qualified for *BRCA1* and *BRCA2* screening tests, in 18.18% of those qualified for a comprehensive next-generation sequencing (NGS) panel in cases of breast and ovarian cancer, and in 17.36% of cases of colorectal and endometrial cancer. The research conducted allowed us to establish individualized preventive and therapeutic approaches for mutation carriers. However, the results prove that liberalizing the inclusion criteria for high-throughput diagnostics and the use of broad gene panels could significantly increase the percentage of detected carriers. This publication serves as a summary and discussion of the results obtained from the implementation of the NCCP as well as of the role of genetic consulting in personalized medicine.

**Keywords:** hereditary breast ovarian cancer; breast cancer; ovarian cancer; hereditary colorectal cancer; colorectal cancer; hereditary endometrial cancer; endometrial cancer; *BRCA1*; *BRCA2*; *CHEK2*; *PALB2*

## 1. Introduction

Cancer is a diverse group of diseases, constituting one of the most significant public health concerns worldwide. While most cancer cases are sporadic, a hereditary form linked to genetic mutations occurs in a significant number of patients. The most common cases of hereditary cancer include breast, ovarian, colon, and uterus cancers. Understanding the genetic basis of these cancers is crucial for risk assessment, early detection, and targeted treatment for individuals prone to these diseases. Genetic testing and counseling play a



significant role in identifying individuals at increased risk and implementing appropriate surveillance programs. The starting point for the formulation of this study's objectives was the identification of founder mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. These mutations are characteristic of the population of females affected by breast and/or ovarian cancers in the north-western region of Poland [1]. The remarkable popularization of *BRCA1* mutation diagnostics through a relatively simple and cost-effective polymerase chain reaction (PCR) test is also worth emphasizing [2]. After over two decades of self-promotion, the topic of preventive research gained recognition and found funding sources within the framework of the National Cancer Control Program (NCCP) coordinated by the Ministry of Health; this framework consisted of two modules: "Module I—early detection of malignant tumors in families at high, hereditary risk of breast and ovarian cancer" and "Module II—early detection and prevention of malignant tumors in families at high, hereditary risk of colorectal and endometrial cancer". The Program's scope was developed by a group of experts, appointed by the Ministry of Health, and included detailed guidelines on patient qualifications, diagnostic methods, and preventive and therapeutic care. The aims of our study were to disseminate the research results and discuss the qualification criteria and the accepted methodology. In addition, we have presented the results of tests performed optionally, i.e., outside the program guidelines, and their effect on the percentage of detected mutation carriers.

## 2. Results

### 2.1. Module I

A total of 953 patients were enrolled in Module I, 141 of whom were classified as the highest-risk group and 372 as the high-risk group. An overview of the results is presented in Table 1. Screening tests for *BRCA1* and *BRCA2* mutations were performed on 880 individuals, leading to the identification of 38 *BRCA1* mutations and 1 *BRCA2* mutation. In total, 843 patients were included in the *CHEK2* and *PALB2* gene mutation tests, wherein nine *CHEK2* and three *PALB2* mutations were revealed. Following the execution of targeted familial diagnostics, 19 carriers of *BRCA1* mutations, 7 carriers of *BRCA2* mutations, 2 carriers of *CHEK2* mutations, and 3 carriers of *PALB2* mutations were identified. Complete sequencing of the *BRCA1* and *BRCA2* genes was conducted for 55 patients; consequently, five *BRCA1* and two *BRCA2* mutations were detected. Additionally, in the assessment of the point mutations beyond the scope of the NCCP, one *RAD51C* mutation, one *CDKN2A* mutation (a variant of conflicting interpretations; thus, it is not listed in Table 1), two *MUTYH* mutations (heterozygous), one *CHEK2* mutation (a variant of uncertain significance), and two *PALB2* mutations were detected, all of which were not covered by the screening examination. The details of the pathogenic and likely pathogenic mutations detected by the next-generation sequencing (NGS) technique are presented in Table 2. In cases where the pedigree-clinical criteria were met and the patients did not qualify for NGS testing (or the test yielded negative results), the diagnostic process was expanded to include multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis, resulting in the identification of five mutations in 76 eligible patients.

### 2.2. Module II

A total of 144 patients were enrolled for genetic testing in Module II. An overview of the detected pathogenic mutations is presented in Table 3. Molecular diagnoses were established in 25 cases (17.36%). We identified eleven mutations in the *APC* gene, which is responsible for familial adenomatous polyposis; five mutations in the *MLH1* and *MSH6* genes, which are associated with Lynch syndrome; one mutation in the *STK11* gene, responsible for the Peutz–Jeghers syndrome; and one heterozygous mutation in the *MUTYH* gene (which is responsible for the recessive polyposis syndrome, thus not listed in Table 3). By employing appropriate evaluative procedures within Module II, the study's diagnostic scope was expanded to include mutations not specified in the detailed program description. Additionally, two *BRCA1* mutations, one *BRCA2* mutation, one *PALB2* mutation, one *NOD2*

mutation (the variant with conflicting interpretations), one *NBN* mutation, and three *ATM* gene mutations were identified.

**Table 1.** Overview of selected tests performed within Module I.

Test	Number of Tests	Number of Pathogenic Mutations	Percentage of Pathogenic Mutations
<i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> screening test	880	39	4.43%
<i>Highest-risk group</i>	141	22	15.60%
<i>High-risk group</i>	372	11	2.96%
<i>CHEK2</i> screening test	843	9	1.07%
<i>Highest-risk group</i>	84	9	10.71%
<i>High-risk group</i>	329	0	0%
<i>PALB2</i> screening test	843	3	0.35%
<i>Highest-risk group</i>	84	0	0%
<i>High-risk group</i>	329	3	0.91%
MLPA <i>BRCA1</i>	70	3	4.29%
MLPA <i>BRCA2</i>	62	2	3.33%
Next-generation sequencing	55	10	18.18%

**Table 2.** Mutations detected using next-generation sequencing.

Gene	Mutation	dbSNP Number	ClinVar Submissions	Internal Classification
<i>BRCA1</i>	NM_007294.4:c.4986+6T>G	rs80358086	12 (P), 2 (LP)	Pathogenic
<i>BRCA1</i>	NM_007294.4:c.81-2A>C	rs397509326	2 (P), 2 (LP)	Pathogenic
<i>BRCA1</i>	NM_007294.4:c.115T>C	rs80357164	15 (P), 1 (VUS)	Pathogenic
<i>BRCA1</i>	NM_007294.4:c.5034_5037del	rs80357580	27 (P)	Pathogenic
<i>BRCA1</i>	NM_007294.4:c.2761C>T	rs80357377	10 (P)	Pathogenic
<i>BRCA2</i>	NM_000059.4:c.3975_3978dup	rs397515636	23 (P)	Pathogenic
<i>BRCA2</i>	NM_000059.4:c.7990_7991del	-	0	Likely pathogenic
<i>PALB2</i>	NM_024675.3:c.2962C>T	rs118203999	8 (P)	Pathogenic
<i>PALB2</i>	NM_024675.3:c.697del	rs180177090	6 (P)	Pathogenic
<i>RAD51C</i>	NM_058216.3:c.577C>T	rs200293302	13 (P), 1 (LP)	Pathogenic

**Table 3.** Overview of mutations detected within Module II.

Gene	Mutation	dbSNP Number	ClinVar Submissions	Internal Classification	Number of Patients
<i>APC</i>	NM_000038.4:c.3927_3931del	rs121913224	30 (P), 1 (LP)	Pathogenic	5
<i>APC</i>	NM_000038.6:c.2626C>T	rs121913333	11 (P), 1 (LP)	Pathogenic	5
<i>APC</i>	NM_000038.6:c.4438C>T	-	1 (P)	Pathogenic	1
<i>MLH1</i>	NM_000249.4:c.83C>T	rs63750792	7 (P), 1 (LP)	Pathogenic	1
<i>MLH1</i>	NM_000249.4:c.1897-2A>G	rs267607871	4 (LP), 5 (VUS)	Pathogenic	1
<i>MSH6</i>	NM_000179:c.423del	rs1114167728	3 (P), 1 (LP)	Pathogenic	3
<i>STK11</i>	NM_000455.5:c.891G>T	rs730881984	1 (P)	Pathogenic	1
<i>BRCA1</i>	NM_007294.4:c.181T>G	rs28897672	56 (P)	Pathogenic	1
<i>BRCA1</i>	NM_007294.4:c.5251C>T	rs80357123	36 (P)	Pathogenic	1
<i>BRCA2</i>	NM_000059.4:c.3076A>T	rs80358552	8 (P)	Pathogenic	1
<i>PALB2</i>	NM_024675.4:c.759del	rs1060499830	2 (P), 1 (LP)	Pathogenic	1
<i>ATM</i>	NM_000051.4:c.742C>T	rs730881336	10 (P), 1 (LP)	Pathogenic	3
<i>NBN</i>	NM_002485.5:c.657_661del	rs587776650	36 (P), 1 (LP)	Pathogenic	1

### 3. Discussion

Breast cancer is the most common malignant tumor among women in Poland, accounting for 22.9% of all cancer cases. It also ranks the second leading cause of cancer-related

deaths, after lung cancer, accounting for 15.1% of deaths [3]. It is estimated that approximately 5–10% of breast cancers have a hereditary basis that can be identified using the current diagnostic methodology [4]. Ovarian cancer is responsible for 4.3% of female cancers and ranks fifth in terms of incidence and fourth in terms of mortality rate (6.0%) [3]. Germ-line mutations can be identified in approximately 25% of ovarian cancers [4]. The most common cause of hereditary breast and ovarian cancers (HBOC) is the presence of mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. In addition, there are high-risk genes, (which are associated with other predisposition syndromes), such as *CDH1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, and *TP53*, as well as moderate-risk genes, including *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *EP-CAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *RAD51C*, and *RAD51D*. In addition to these genes, a high risk for ovarian cancer is associated with mutations in the *DICER1*, *VHL*, *PTCH1*, *SUFU*, *SMARCB1*, and *SMARCA4* genes. Colorectal cancer is the third most commonly diagnosed malignant tumor among men (accounting for 6.8% of all cases) and the fourth most common among women (5.9%). It is the third leading cause of death for both men and women (8.0% and 7.7%, respectively). Approximately 5% of colorectal cancer patients develop the disease due to a hereditary predisposition, with the most common types being Lynch syndrome (approximately 2–4% of patients) and familial adenomatous polyposis (approximately 1% of patients) [4]. Endometrial cancer is the third most common cancer in women (7.0%) and the sixth leading cause of death (4.0%). Similar to colorectal cancer, Lynch syndrome is the most common inducer of familial risk for endometrial cancer [4].

The tasks of the National Cancer Control Program, coordinated by the Ministry of Health, aim to provide specialized prevention measures for families at increased familial risk. The introduction of the program in 2018 was a breakthrough for genetic diagnostics in this area in Poland, and it also increased our knowledge about the role of genetic factors in the development of genetic diseases. The educational aspect of this program, i.e., increasing the awareness of genetic testing and preventive measures among patients, is undoubtedly its key advantage. The results presented in this study indicate that a fairly high percentage of pathogenic mutation carriers was detected. Screening tests for founder *BRCA1/BRCA2* mutations yielded positive results for 4.43% of the qualified patients (15.60% in the highest-risk group); most of these mutations were founder mutations of the *BRCA1* gene, constituting a finding similar to results published earlier for the north-western region of Poland [1,5,6]. The simple qualification criteria employed in this study provide an additional benefit of the screening tests, enabling other specialists, like oncologists or gynecologists, to take their first steps into the domain of genetic tests. This may also be a crucial time-reduction factor for patients on waiting lists, which are usually rather long in the countries like Poland, where access to clinical geneticists is still rather limited.

It should, however, be noted that the diagnostic apparatus of the program did not identify all families with an increased cancer risk, although this should be possible considering today's state-of-the-art technological potential. When describing the program's results, it is important to mention that due to the additional involvement of our genetic facility, we were able to identify 16 families with high- or intermediate-risk mutations and who thus failed to meet the criteria for the tests in question. This result accounted for as much as 17.58% of all the detected mutations. During the implementation of the program, we identified two *PALB2* mutations and one *RAD51C* mutation as well as five deletions in *BRCA1/BRCA2* genes via MLPA, amounting to 12.12% of the positive results in Module I that could have remained undetected with the testing limitations assumed in the NCCP. In addition, two patients with *MUTYH* mutations were identified in Module I, thereby facilitating comprehensive genetic consulting for both the patients and their families. Also, in Module II, we identified two mutations in *BRCA1*, one mutation in *BRCA2*, one mutation in *PALB2*, three mutations in *ATM*, and one mutation in *NBN* in the patients who qualified for molecular testing for Lynch syndrome (and failed to meet either the criteria of the HBOC or the inclusion criteria for Module I). This amounts to 32% of the positive results in Module II. Considering the fact that the expansion of the diagnostic scope, specified in the program, yielded diagnostic results in a minority of cases, it may be assumed that the



real number of undetected carriers of pathogenic mutations may be significantly higher. The PCR-based screening tests focused on specific DNA regions. At the same time, the NGS enabled the simultaneous sequencing of longer DNA fragments, which enabled the sequencing of multiple genes at once, thereby substantially increasing the throughput and scalability figures.

Therefore, offering a high-throughput diagnostic apparatus to a broader group of patients seems highly justified. The design of the program discussed herein focused on screening tests for economic reasons, as the cost of screening tests is several times lower than that of high-throughput tests. However, it is worth noting that the costs of comprehensive genetic diagnostics account for no more than 1% of the costs of the oncological care of affected patients. Hopefully, future cost evaluations will consider not only single cost areas but also long-term clinical benefits, such as higher percentages of effectively cured patients, more effective systemic treatments, shorter sick leave periods, and reduced cancer mortality rates. The hitherto-followed practice of adhering to the international recommendations of scientific societies should be expedited and further supplemented by a comprehensive cost analysis, encompassing all the elements of personalized prevention, diagnostics, potential therapy, and rehabilitation leading to health maintenance. A case in point could involve the augmentation (or omission) of specific molecular tests in favor of high-coverage next-generation sequencing procedures. Another pressing concern pertains to horizontal integration, which more profoundly accounts for collaboration among the diverse medical realms (with various medical specialties) engaged in the prevention, diagnostics, and treatment of neoplastic ailments.

On the other hand, high-throughput testing creates problems regarding interpretation. During the implementation of the program discussed herein, we came across conflicting interpretations (*CDKN2A* NM\_000077.5:c.442G>A, *NOD2* NM\_022162.2:c.3019dup, and *CHEK2* NM\_007194.4 c.470T>C), a variant of uncertain significance (*CHEK2* NM\_007194.4 c.1211A>G), and a variant never reported (the NM\_000059.4:c.7990\_7991del in *BRCA2* gene). Despite advances in sequencing technologies, a method for distinguishing between such variants' pathogenic and benign characteristics remains elusive. Integrating diverse data sources and population databases is crucial for accurate classification, enhancing precision in clinical decision making. It is necessary to confer with highly qualified genetic consultants to explain these variants to patients. Additionally, identifying such variants emphasizes the significance of functional studies, which are rarely performed in cases of hereditary syndromes but are crucial to clarify the meaning of the detected variants.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Patient Qualification—Module I

The patients who attended our clinic were most often residents of the Voivodeship of Lodz, where our facility is located. Due to the high diagnostic potential of our clinic, we also received patients from neighboring voivodeships, especially from Mazovia, Greater Poland, Silesia, Lower Silesia, and Lesser Poland. The criteria proposed in the NCCP were used in the process of qualifying patients for Module I. A group of individuals at high and highest risks were identified based on the division outlined in the detailed description of the program employed. In ambiguous situations, the criteria for hereditary breast-ovarian cancer syndrome (HBOC) were followed, as outlined in the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.2534>, accessed on 21 August 2023). Regardless of a patient's program eligibility status, the specific criteria for inclusion in genetic testing were applied.

#### 4.1.1. Qualification Criteria for the Highest-Risk Group

The individuals who qualified for inclusion in the highest-risk group were as follows:

- Individuals from families with 3 or more cases of breast cancer and/or ovarian cancer among first- and second-degree relatives (including the proband);

- Individuals identified with a pathogenic mutation in the *BRCA1*, *BRCA2*, or *PALB2* genes, regardless of their family history.

#### 4.1.2. Qualification Criteria for the High-Risk Group

A high risk of developing breast and/or ovarian cancer (at least 4–5 times higher than that in the general population) qualified a given patient for inclusion in the high-risk group, for which the following clinical criteria were applied:

- Families with 2 cases of breast and/or ovarian cancer among the proband or first- and second-degree relatives (or 2 cases among second- and third-degree relatives on the paternal side), particularly when at least one affected individual had been diagnosed with ovarian cancer and one case of said cancer had occurred before the age of 50.
- Families with bilateral breast cancer diagnosed in first- and second-degree relatives.
- Families with breast cancer diagnosed before the age of 40 in first- and second-degree relatives.
- Families with breast cancer diagnosed in males among first- and second-degree relatives.

#### 4.1.3. Qualification for Genetic Testing

The primary screening tests for the 5 most common mutations in the *BRCA1* gene in the Polish population included the following individuals:

- All individuals diagnosed with ovarian/fallopian tube/peritoneal cancer;
- All individuals diagnosed with breast cancer;
- First- and second-degree relatives of individuals with breast and/or ovarian cancer for whom marker mutations could not be established and diagnostics could not be employed for the affected individual.

The basic screening tests for the 3 most common protein-truncating mutations in the *CHEK2* gene and 2 mutations in the *PALB2* gene in the Polish population were designed to include the following individuals:

- All individuals diagnosed with breast cancer;
- First-degree relatives of individuals with breast cancer from families meeting the criteria for high and the highest risk of breast cancer.

Only individuals who had been diagnosed with breast and/or ovarian cancer without presenting any of the 5 most common *BRCA1* mutations were qualified to participate in the examination of *BRCA1* and *BRCA2* mutation carrier status using next generation sequencing (NGS), provided that the following conditions were met:

- The affected individual had been diagnosed with breast cancer or ovarian cancer and had at least 2 first- or second-degree relatives with a diagnosis of breast and/or ovarian cancer, where at least one of such cases had occurred before the age of 50;
- The affected individual had been diagnosed with breast cancer before the age of 50 or ovarian cancer at any age and had a first- or second-degree relative who had been diagnosed with breast cancer (breast cancer in males) and/or ovarian cancer;
- The same affected individual had been diagnosed with both breast and ovarian cancer or bilateral breast cancer, including at least one case below the age of 50;
- The affected individual had been diagnosed with ovarian cancer and had at least one relative with breast cancer—which had been diagnosed before the age of 50—or who had been diagnosed with ovarian cancer.

Furthermore, all the family members for whom the highest or high-risk mutation was identified were eligible for examinations to determine their carrier status.

#### 4.2. Patient Qualification—Module II

A clinical geneticist enrolled the patients based on their detailed family histories (including information on all their relatives, such as the age at the onset of cancer and the type/location of tumors among those relatives, as well as data on unaffected rela-

tives). No clinical criteria were defined in the program for hereditary gastrointestinal cancer syndromes; therefore, the patients were qualified individually by the consulting clinical geneticists.

#### 4.3. Laboratory Methodology

By exploiting the funding available for the screening tests, the following five mutations, most frequently occurring in the *BRCA1* gene within the Polish population, were identified: c.68\_69del, c.4035del, c.5266dup, c.3700\_3704del, and c.181T>G [7]; these mutations accounted for approximately 62% of all the identified mutations in the *BRCA1* gene in Poland [8]. Additionally, the following three most common protein-truncating mutations in the *CHEK2* gene were identified: 1100del, IVS+1G>A, and del5395. Furthermore, the two most common mutations in the *PALB2* gene were identified, namely, c.509\_510del and c.172\_175del [9]. An overview of the mutations identified in screening tests are presented in Tables 4 and 5.

**Table 4.** Overview of the mutations identified in the *BRCA1* and *BRCA2* genes during the mutation-screening test.

Gene	HGVS Variant	The Common Name of Mutation	Comment
BRCA1	NM_007294.3:c.5266dup	5382insC	Mutation included in the NCCP
BRCA1	NM_007294.3:c.181T>G	C61G	Mutation included in the NCCP
BRCA1	NM_007294.3:c.4035del	4153delA	Mutation included in the NCCP
BRCA1	NM_007294.3:c.68_69del	185delAG	Mutation included in the NCCP
BRCA1	NM_007294.3:c.3700_3704del	3819del 5	Mutation included in the NCCP
BRCA1	NM_007294.3:c.3756_3759del	-	Mutation investigated additionally.
BRCA1	NM_007294.3:c.1961del	-	Mutation investigated additionally.
BRCA2	NM_000059.3:c.5946del	-	Mutation investigated additionally.

**Table 5.** Overview of mutations identified in the *CHEK2* and *PALB2* genes during the mutation-screening test.

Gene	HGVS Variant	The Common Name of Mutation	Comment
CHEK2	NM_007194.3:c.444+1G>A	IVS+1G>A	-
CHEK2	NM_007194.3:c.1100del	1100delC	-
CHEK2	NM_007194.3:c.909-?_1095+?del	del 5395	-
PALB2	NM_024675.3:c.509_510del	-	-
PALB2	NM_024675.3:c.172_175del	-	-

Screening for mutations in the *BRCA1* gene was performed using the R-27/P-48FRT Oncogenetics BRCA Panel based on a Real-Time PCR reaction (Sacace Biotechnologies, Como, Italy). A Real-Time PCR (RT-PCR) reaction was carried out using the Qiagen RotorGene Q instrument (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). An analysis of the obtained variants was performed by means of the Rotor-Gene Q 2.1.0.9 software (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The use of the aforementioned method enabled the detection of the five most common mutations included in Module I of the program as well as two additional mutations in the *BRCA1* gene and one mutation in the *BRCA2* gene.

Conventional Sanger sequencing and allele-specific amplification PCR (in case of the del5395 mutation) were employed to screen the most common mutations in the *CHEK2* and *PALB2* genes.

Moreover, conventional Sanger sequencing was the method of choice for familial variant carrier testing, when the familial variant carriers were not detectable, using the rapid RT-PCR test. The complete sequencing of the *BRCA1* and *BRCA2* genes using next-generation sequencing was outsourced to subcontractors. Whenever possible and indicated to be required, the diagnostic process was supplemented outside of the NCCP by examining

extensive deletions and duplications in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, for which the MLPA method with SALSA MLPA Probemix P002-D1-0918 and SALSA MLPA Probemix P045 D1-0519 kits was used, and the complete sequencing of other genes, correlated with cancer predisposition, besides the *BRCA1* and *BRCA2* genes was employed (these genes included *AKT1*, *APC*, *ATM*, *AXIN2*, *BARD1*, *BMPR1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDC73*, *CDH1*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *CTNNA1*, *DICER1*, *EPCAM*, *FANCC*, *FH*, *GALNT12*, *GDNF*, *GREM1*, *HNF1A*, *HNF1B*, *HOXB13*, *KIF1B*, *MAX*, *MC1R*, *MEN1*, *MET*, *MITF*, *MLH1*, *MLH3*, *MRE11*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PIK3CA*, *PMS2*, *POLD1*, *POLE*, *POT1*, *PRKAR1A*, *PRSS1*, *PTCH1*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RB1*, *RET*, *SDHA*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SMAD4*, *STK11*, *TERT*, *TGFBR2*, *TMEM127*, *TP53*, *TSC1*, *TSC2*, *VHL*, *WT1*, *XRCC2*, and *XRCC3*).

In Module II, the same panel of 70 genes (including the detailed analysis of genes such as *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *STK11*, *SMAD4*, *BMPR1A*, *EPCAM*, and *MUTYH*) was used for diagnostic purposes, using next-generation sequencing technology, together with MLPA kits, to identify deletions and duplications in the genes associated with specific clinical diagnoses.

The scheme behind the inclusion of molecular methods in the diagnostic process has been depicted using a block chart (Figure 1). It is important to note that not every patient underwent the whole process; some had selected tests performed in the past or could not participate in consecutive steps.

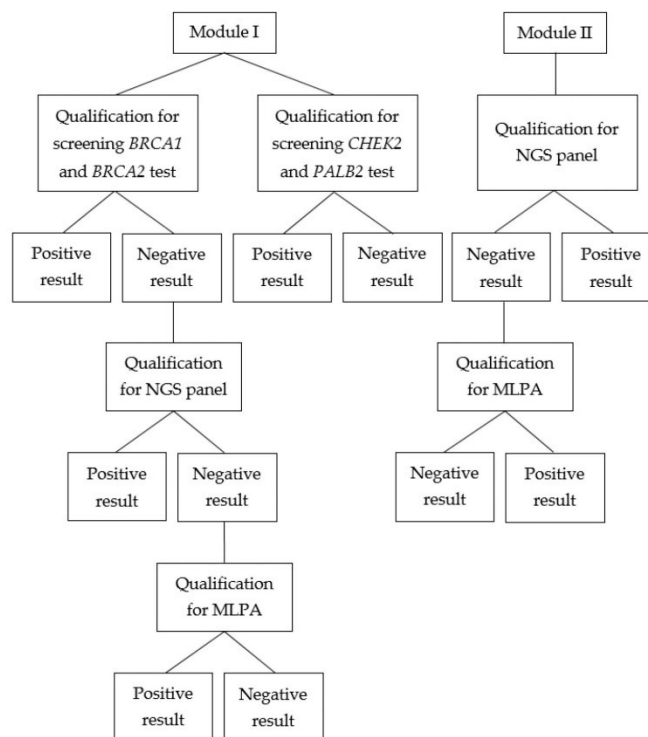


Figure 1. Block chart presenting qualification for genetic testing and diagnostic process.

#### 4.4. Editorial Policy and Ethical Considerations

The authors obtained written informed consent for clinical genetic testing and anonymous publication of results from the patients in accordance with applicable local laws. In the case of patients tested in NCCP, consent forms were provided by the Ministry of Health; in other cases, an interior declaration was used. This study was approved by the Bioethics Committee of the Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute (approval number 80/2017). All the procedures performed in this study followed the principles of the Declaration of Helsinki.

#### 5. Conclusions

In conclusion, the prevalence of hereditary mutations in breast, ovarian, colorectal, and endometrial cancers highlights the significance of molecular testing and genetic consulting with respect to these malignancies. The National Cancer Control Program has provided specialized preventive measures for families at elevated familial risk and increased patient awareness regarding genetic testing and preventative strategies. This study was performed using a representative group of 1097 individuals, constituting a significant quantity with which to draw meaningful conclusions. The program's results demonstrate that a considerable percentage of pathogenic mutation carriers was identified, underscoring the benefits of screening tests, particularly for founder *BRCA1* mutations. This program's simplified qualification criteria offer an additional advantage by enabling specialists from various fields to initiate genetic testing, which has expanded the availability of diagnostics. On the other hand, the referral of patients by different specialists hindered the consistency of the diagnostics workflow and caused the placement of genetic consultations in different stages of the therapeutic process. The expansions of the diagnostic scope revealed many other mutations that could have been missed under the employed program's criteria. The additional involvement of our facility allowed us to demonstrate the inadequacies of the NCCP's assumptions. In this context, the emergence of high-coverage next-generation sequencing holds great potential. While economic considerations initially favored screening tests, the long-term clinical benefits of comprehensive genetic diagnostics, including increased patient cure rates, more effective treatments, and reduced cancer mortality rates, warrant comprehensive cost evaluations. Nevertheless, challenges in interpreting high-throughput data highlight the need for highly qualified genetic consulting to navigate variant interpretations and uncertainties.

**Author Contributions:** Data curation, D.K., M.S. and Z.G.-S.; Investigation, T.K. (Tobiasz Kubicki); Methodology, M.B. and J.S.; Supervision, A.G. and B.K.; Writing—original draft, T.K. (Tadeusz Kałużewski) and I.K.; Writing—review and editing, Ł.K., R.T. and A.B.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute under grant number 2021.2/3/3-GW. Health services performed under the program were financed by the Polish Ministry of Health.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of the Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute (protocol code 80/2017).

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

**Data Availability Statement:** Due to the nature of this research and the corresponding ethical and legal considerations, supporting data are not available.

**Acknowledgments:** The program's implementers and the authors of this publication would like to thank the Management Board of the Great Orchestra of Christmas Charity (WOŚP) Foundation for their financial support of the Hospital in Zduńska Wola, which enabled the acquisition of high-end diagnostic equipment for the Regional Center for Cancer Prevention at the Hospital in Zduńska Wola, as well as Zduńska Wola District Hospital Sp. z o.o. itself for effective cooperation in realizing



the program. The authors also thank Jan Lubiński (at the Pomeranian Medical University) for his comprehensive specialist consultations that facilitated the achievement of the program's goals.

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

## References

1. Górski, B.; Jakubowska, A.; Huzarski, T.; Byrski, T.; Gronwald, J.; Grzybowska, E.; Mackiewicz, A.; Stawicka, M.; Bebenek, M.; Sorokin, D.; et al. A High Proportion of Founder BRCA1 Mutations in Polish Breast Cancer Families. *Int. J. Cancer* **2004**, *110*, 683–686. [CrossRef]
2. Górski, B.; Lubiński, J. BRCA1 Testing. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **2008**, *6*, 81–82. [CrossRef] [PubMed]
3. Dzidkowska, J.; Wojciechowska, U.; Czaderny, K.; Olasek, P.; Ciuba, A. *Nowotwory Złośliwe w Polsce w 2019 Roku*; Ministerstwo Zdrowia: Warsaw, Poland, 2021.
4. American Cancer Society | Cancer Facts & Statistics. Available online: <http://cancerstatisticscenter.cancer.org/> (accessed on 23 July 2022).
5. Menkiszak, J.; Gronwald, J.; Górski, B.; Jakubowska, A.; Huzarski, T.; Byrski, T.; Foszczyńska-Kłoda, M.; Haus, O.; Janiszewska, H.; Perkowska, M.; et al. Hereditary Ovarian Cancer in Poland. *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 942–945. [CrossRef] [PubMed]
6. Szewiec, M.; Jakubowska, A.; Górski, B.; Huzarski, T.; Tomiczek-Szewiec, J.; Gronwald, J.; Dębniak, T.; Byrski, T.; Kluźniak, W.; Wokołorczyk, D.; et al. Recurrent Mutations of BRCA1 and BRCA2 in Poland: An Update. *Clin. Genet.* **2015**, *87*, 288–292. [CrossRef] [PubMed]
7. Wojcik, P.; Jasiowska, M.; Strycharz, E.; Sobol, M.; Hodorowicz-Zaniewska, D.; Skotnicki, P.; Byrski, T.; Blecharz, P.; Marczyk, E.; Cedrych, I.; et al. Recurrent Mutations of BRCA1, BRCA2 and PALB2 in the Population of Breast and Ovarian Cancer Patients in Southern Poland. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **2016**, *14*, 5. [CrossRef] [PubMed]
8. Lubiński, J. *Genetyka Kliniczna Nowotworów 2018*; libroprint.pl: Szczecin, Poland, 2018.
9. Złowocka-Perłowska, E.; Dębniak, T.; Słojewski, M.; Lemiński, A.; Soczawa, M.; van de Wetering, T.; Trubicka, J.; Kluźniak, W.; Wokołorczyk, D.; Cybulski, C.; et al. Recurrent PALB2 Mutations and the Risk of Cancers of Bladder or Kidney in Polish Population. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **2021**, *19*, 6. [CrossRef] [PubMed]

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

#### **14. Zgoda komisji bioetycznej**

Prace składające się na cykl publikacji zostały przeprowadzone zgodnie z założeniami Deklaracji Helsińskiej oraz dobrymi praktykami prowadzenia badań naukowych. W adekwatnym zakresie wyrażona została pozytywna opinia Komisji Bioetyki Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi (opinia numer 80/2017).

## 15. Piśmiennictwo

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *Int J Cancer* **2021**, doi:10.1002/ijc.33588.
2. Causes of Death Statistics Available online: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes\\_of\\_death\\_statistics](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics) (accessed on 22 August 2024).
3. Dyba, T.; Randi, G.; Bray, F.; Martos, C.; Giusti, F.; Nicholson, N.; Gavin, A.; Flego, M.; Neamtiu, L.; Dimitrova, N.; et al. The European Cancer Burden in 2020: Incidence and Mortality Estimates for 40 Countries and 25 Major Cancers. *European Journal of Cancer* **2021**, *157*, 308–347, doi:10.1016/j.ejca.2021.07.039.
4. Didkowska, J.; Barańska, K.; Miklewska, M.J.; Wojciechowska, U. Cancer Incidence and Mortality in Poland in 2023. *Nowotwory. Journal of Oncology* **2024**, *74*, 75–93, doi:10.5603/njo.99065.
5. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
6. Debyani Chakravarty; Chakravarty, D.; David B. Solit; Solit, D.B. Clinical Cancer Genomic Profiling. *Nature Reviews Genetics* **2021**, *22*, 483–501, doi:10.1038/s41576-021-00338-8.
7. Narod, S.A.; Foulkes, W.D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and Beyond. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 665–676, doi:10.1038/nrc1431.
8. Bülow, S.; Berk, T.; Neale, K. The History of Familial Adenomatous Polyposis. *Familial Cancer* **2006**, *5*, 213–220, doi:10.1007/s10689-005-5854-0.
9. Kumar-Sinha, C.; Chinnaiyan, A.M. Precision Oncology in the Age of Integrative Genomics. *Nat Biotechnol* **2018**, *36*, 46–60, doi:10.1038/nbt.4017.
10. Leslie H. Sobin; Sobin, L.H.; L. H. Sobin The International Histological Classification of Tumours. *Bulletin of The World Health Organization* **1981**, *59*, 813–819.
11. Katherine A. Hoadley; Hoadley, K.A.; Christina Yau; Yau, C.; Denise M. Wolf; Wolf, D.M.; Andrew D. Cherniack; Cherniack, A.D.; David Tamborero; Tamborero, D.; et al. Multiplatform Analysis of 12 Cancer Types Reveals Molecular Classification within and across Tissues of Origin. *Cell* **2014**, *158*, 929–944, doi:10.1016/j.cell.2014.06.049.

12. Peter Bouwman; Bouwman, P.; Jos Jonkers; Jonkers, J.; Jonkers, J. The Effects of Deregulated DNA Damage Signalling on Cancer Chemotherapy Response and Resistance. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12*, 587–598, doi:10.1038/nrc3342.
13. Mark Yarchoan; Yarchoan, M.; Alexander C. Hopkins; Hopkins, A.; Elizabeth M. Jaffee; Jaffee, E.M. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *The New England Journal of Medicine* **2017**, *377*, 2500–2501, doi:10.1056/nejmc1713444.
14. David M. Hyman; Hyman, D.M.; Igor Puzanov; Puzanov, I.; Vivek Subbiah; Subbiah; Subbiah, V.; Jason E. Faris; Faris, J.E.; Ian Chau; et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *The New England Journal of Medicine* **2015**, *373*, 726–736, doi:10.1056/nejmoa1502309.
15. Alexander Drilon; Drilon, A.; Theodore W. Laetsch; Laetsch, T.W.; Laetsch, T.W.; Shivaani Kummar; Kummar, S.; Steven G. DuBois; DuBois, S.G.; Ulrik Lassen; et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion–Positive Cancers in Adults and Children. *The New England Journal of Medicine* **2018**, *378*, 731–739, doi:10.1056/nejmoa1714448.
16. David M. Hyman; Hyman, D.M.; Lillian M. Smyth; Smyth, L.M.; Smyth, L.M.; Smyth, L.M.; Mark T.A. Donoghue; Donoghue Mta; Donoghue, M.T.A.; Shannon N. Westin; et al. AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *Journal of Clinical Oncology* **2017**, *35*, 2251–2259, doi:10.1200/jco.2017.73.0143.
17. Elizabeth Mansfield; Mansfield, E. FDA Perspective on Companion Diagnostics: An Evolving Paradigm. *Clinical Cancer Research* **2014**, *20*, 1453–1457, doi:10.1158/1078-0432.ccr-13-1954.
18. Ahmet Zehir; Zehir, A.; Ryma Benayed; Benayed, R.; Ronak Shah; Shah, R.; Aijazuddin Syed; Syed, A.; Sumit Middha; Middha, S.; et al. Mutational Landscape of Metastatic Cancer Revealed from Prospective Clinical Sequencing of 10,000 Patients. *Nature Medicine* **2017**, *23*, 703–713, doi:10.1038/nm.4333.
19. Lynette M. Sholl; Sholl, L.M.; T. Khanh; T., K.; Priyanka Shivdasani; Shivdasani, P.; Ethan Cerami; Cerami, E.; Adrian M. Dubuc; Dubuc, A.M.; et al. Institutional Implementation of Clinical Tumor Profiling on an Unselected Cancer Population. *JCI insight* **2016**, *1*, doi:10.1172/jci.insight.87062.
20. Funda Meric-Bernstam; Meric-Bernstam, F.; Lauren Brusco; Kenna Shaw; Brusco, L.; Shaw, K.R.M.; Kenna Shaw; Chacha Horombe; Horombe, C.; Scott Kopetz; et al. Feasibility of Large-Scale Genomic Testing to Facilitate Enrollment

- Onto Genomically Matched Clinical Trials. *Journal of Clinical Oncology* **2015**, 33, 2753–2762, doi:10.1200/jco.2014.60.4165.
21. Tracy L. Stockley; Stockley, T.; Amit M. Oza; Oza, A.M.; Hal K. Berman; Berman, H.K.; Natasha B. Leighl; Leighl, N.B.; Jennifer J. Knox; Knox, J.J.; et al. Molecular Profiling of Advanced Solid Tumors and Patient Outcomes with Genotype-Matched Clinical Trials: The Princess Margaret IMPACT/COMPACT Trial. *Genome Medicine* **2016**, 8, 109–109, doi:10.1186/s13073-016-0364-2.
  22. Brannon, A.R.; Vakiani, E.; Sylvester, B.E.; Scott, S.N.; McDermott, G.; Shah, R.H.; Kania, K.; Viale, A.; Oschwald, D.M.; Vacic, V.; et al. Comparative Sequencing Analysis Reveals High Genomic Concordance between Matched Primary and Metastatic Colorectal Cancer Lesions. *Genome Biol* **2014**, 15, 454, doi:10.1186/s13059-014-0454-7.
  23. Cheng, D.T.; Mitchell, T.N.; Zehir, A.; Shah, R.H.; Benayed, R.; Syed, A.; Chandramohan, R.; Liu, Z.Y.; Won, H.H.; Scott, S.N.; et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn* **2015**, 17, 251–264, doi:10.1016/j.jmoldx.2014.12.006.
  24. Frampton, G.M.; Fichtenholtz, A.; Otto, G.A.; Wang, K.; Downing, S.R.; He, J.; Schnall-Levin, M.; White, J.; Sanford, E.M.; An, P.; et al. Development and Validation of a Clinical Cancer Genomic Profiling Test Based on Massively Parallel DNA Sequencing. *Nat Biotechnol* **2013**, 31, 1023–1031, doi:10.1038/nbt.2696.
  25. Van Allen, E.M.; Wagle, N.; Stojanov, P.; Perrin, D.L.; Cibulskis, K.; Marlow, S.; Jane-Valbuena, J.; Friedrich, D.C.; Kryukov, G.; Carter, S.L.; et al. Whole-Exome Sequencing and Clinical Interpretation of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Samples to Guide Precision Cancer Medicine. *Nat Med* **2014**, 20, 682–688, doi:10.1038/nm.3559.
  26. Wagle, N.; Berger, M.F.; Davis, M.J.; Blumenstiel, B.; Defelice, M.; Pochanard, P.; Ducar, M.; Van Hummelen, P.; Macconail, L.E.; Hahn, W.C.; et al. High-Throughput Detection of Actionable Genomic Alterations in Clinical Tumor Samples by Targeted, Massively Parallel Sequencing. *Cancer Discov* **2012**, 2, 82–93, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0184.

27. Won, H.H.; Scott, S.N.; Brannon, A.R.; Shah, R.H.; Berger, M.F. Detecting Somatic Genetic Alterations in Tumor Specimens by Exon Capture and Massively Parallel Sequencing. *J Vis Exp* **2013**, e50710, doi:10.3791/50710.
28. Xue, Y.; Wilcox, W.R. Changing Paradigm of Cancer Therapy: Precision Medicine by next-Generation Sequencing. *Cancer Biol Med* **2016**, *13*, 12–18, doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0003.
29. Garraway, L.A. Genomics-Driven Oncology: Framework for an Emerging Paradigm. *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 1806–1814, doi:10.1200/JCO.2012.46.8934.
30. Meric-Bernstam, F.; Farhangfar, C.; Mendelsohn, J.; Mills, G.B. Building a Personalized Medicine Infrastructure at a Major Cancer Center. *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 1849–1857, doi:10.1200/JCO.2012.45.3043.
31. Chakravarty, D.; Johnson, A.; Sklar, J.; Lindeman, N.I.; Moore, K.; Ganesan, S.; Lovly, C.M.; Perlmutter, J.; Gray, S.W.; Hwang, J.; et al. Somatic Genomic Testing in Patients With Metastatic or Advanced Cancer: ASCO Provisional Clinical Opinion. *J Clin Oncol* **2022**, *40*, 1231–1258, doi:10.1200/JCO.21.02767.
32. Géraldine Perkins; G, P.; Hanqing Lu; H, L.; Fanny Garlan; Garlan, F.; F, G.; Valérie Taly; Taly, V.; Taly Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. *Advances in Clinical Chemistry* **2017**, *79*, 43–91, doi:10.1016/bs.acc.2016.10.001.
33. Principles and Practice of Screening for Disease. *J R Coll Gen Pract* **1968**, *16*, 318.
34. Katarzyna Kotulska; Katarzyna Kotulska; Sergiusz Jozwiak; Sergiusz Jozwiak; Maria Jędrzejowska; Maria Jędrzejowska; Monika Gos; Monika Goś; Magdalena Ogrodnik; Magdalena Ogrodnik; et al. Newborn Screening and Gene Therapy in SMA: Challenges Related to Vaccinations. *Frontiers in Neurology* **2022**, *13*, doi:10.3389/fneur.2022.890860.
35. Sana Raoof; Raoof, S.; Caleb J. Kennedy; Kennedy, C.J.; D. A. Wallach; Wallach, D.A.; Asaf Bitton; Bitton, A.; Robert C. Green; Green, R.C. Molecular Cancer Screening: In Search of Evidence. *Nature Medicine* **2021**, *27*, 1139–1142, doi:10.1038/s41591-021-01431-5.
36. Nicholas Potter; Potter, N.T.; Patrick Hurban; Hurban, P.; Mary N. White; White, M.N.; Kara D. Whitlock; Whitlock, K.D.; Catherine Lofton–Day; Lofton-Day, C.; et al. Validation of a Real-Time PCR–Based Qualitative Assay for the Detection of

- Methylated SEPT9 DNA in Human Plasma. *Clinical Chemistry* **2014**, *60*, 1183–1191, doi:10.1373/clinchem.2013.221044.
37. Thomas F. Imperiale; Imperiale, T.F.; David F. Ransohoff; Ransohoff, D.F.; Steven H. Itzkowitz; Itzkowitz, S.H.; Theodore R. Levin; Levin, T.R.; Philip T. Lavin; Lavin, P.T.; et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *The New England Journal of Medicine* **2014**, *370*, 1287–1297, doi:10.1056/nejmoa1311194.
38. Chung, D.C.; Gray, D.M.; Singh, H.; Issaka, R.B.; Raymond, V.M.; Eagle, C.; Hu, S.; Chudova, D.I.; Talasaz, A.; Greenson, J.K.; et al. A Cell-Free DNA Blood-Based Test for Colorectal Cancer Screening. *New England Journal of Medicine* **2024**, *390*, 973–983, doi:10.1056/NEJMoa2304714.
39. Gittelman, M.C.; Hertzman, B.; Bailen, J.; Williams, T.; Koziol, I.; Henderson, R.J.; Efros, M.; Bidair, M.; Ward, J.F. PCA3 Molecular Urine Test as a Predictor of Repeat Prostate Biopsy Outcome in Men with Previous Negative Biopsies: A Prospective Multicenter Clinical Study. *J Urol* **2013**, *190*, 64–69, doi:10.1016/j.juro.2013.02.018.
40. Cornford, P.; van den Bergh, R.C.N.; Briers, E.; Van den Broeck, T.; Brunckhorst, O.; Darragh, J.; Eberli, D.; De Meerleer, G.; De Santis, M.; Farolfi, A.; et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-ISUP-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2024 Update. Part I: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol* **2024**, *86*, 148–163, doi:10.1016/j.eururo.2024.03.027.
41. Nestler, T.; Schoch, J.; Belge, G.; Dieckmann, K.-P. MicroRNA-371a-3p—The Novel Serum Biomarker in Testicular Germ Cell Tumors. *Cancers (Basel)* **2023**, *15*, 3944, doi:10.3390/cancers15153944.
42. Patrikidou, A.; Cazzaniga, W.; Berney, D.; Boormans, J.; de Angst, I.; Di Nardo, D.; Fankhauser, C.; Fischer, S.; Gravina, C.; Gremmels, H.; et al. European Association of Urology Guidelines on Testicular Cancer: 2023 Update. *European Urology* **2023**, *84*, 289–301, doi:10.1016/j.eururo.2023.04.010.
43. Lobo, J.; Leão, R.; Gillis, A.J.M.; van den Berg, A.; Anson-Cartwright, L.; Atenafu, E.G.; Kuhathaas, K.; Chung, P.; Hansen, A.; Bedard, P.L.; et al. Utility of Serum miR-371a-3p in Predicting Relapse on Surveillance in Patients with Clinical Stage I Testicular Germ Cell Cancer. *European Urology Oncology* **2021**, *4*, 483–491, doi:10.1016/j.euo.2020.11.004.



44. Chen, M.; Zhao, H. Next-Generation Sequencing in Liquid Biopsy: Cancer Screening and Early Detection. *Human Genomics* **2019**, *13*, 34, doi:10.1186/s40246-019-0220-8.
45. De Rubis, G.; Krishnan, S.R.; Bebawy, M. Circulating Tumor DNA - Current State of Play and Future Perspectives. *Pharmacol Res* **2018**, *136*, 35–44, doi:10.1016/j.phrs.2018.08.017.
46. Lennon, A.M.; Buchanan, A.H.; Kinde, I.; Warren, A.; Honushefsky, A.; Cohain, A.T.; Ledbetter, D.H.; Sanfilippo, F.; Sheridan, K.; Rosica, D.; et al. Feasibility of Blood Testing Combined with PET-CT to Screen for Cancer and Guide Intervention. *Science* **2020**, *369*, eabb9601, doi:10.1126/science.abb9601.
47. Liu, M.C.; Oxnard, G.R.; Klein, E.A.; Swanton, C.; Seiden, M.V.; CCGA Consortium Sensitive and Specific Multi-Cancer Detection and Localization Using Methylation Signatures in Cell-Free DNA. *Ann Oncol* **2020**, *31*, 745–759, doi:10.1016/j.annonc.2020.02.011.
48. Aravanis, A.M.; Lee, M.; Klausner, R.D. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell* **2017**, *168*, 571–574, doi:10.1016/j.cell.2017.01.030.
49. Chen, X.; Gole, J.; Gore, A.; He, Q.; Lu, M.; Min, J.; Yuan, Z.; Yang, X.; Jiang, Y.; Zhang, T.; et al. Non-Invasive Early Detection of Cancer Four Years before Conventional Diagnosis Using a Blood Test. *Nat Commun* **2020**, *11*, 3475, doi:10.1038/s41467-020-17316-z.
50. Pulumati, A.; Pulumati, A.; Dwarakanath, B.S.; Verma, A.; Papineni, R.V.L. Technological Advancements in Cancer Diagnostics: Improvements and Limitations. *Cancer Rep (Hoboken)* **2023**, *6*, e1764, doi:10.1002/cnr2.1764.
51. Kloth, M.; Buettner, R. Changing Histopathological Diagnostics by Genome-Based Tumor Classification. *Genes* **2014**, *5*, 444–459, doi:10.3390/genes5020444.
52. Tothill, R.W.; Kowalczyk, A.; Rischin, D.; Bousioutas, A.; Haviv, I.; van Laar, R.K.; Waring, P.M.; Zalcberg, J.; Ward, R.; Biankin, A.V.; et al. An Expression-Based Site of Origin Diagnostic Method Designed for Clinical Application to Cancer of Unknown Origin. *Cancer Res* **2005**, *65*, 4031–4040, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3617.
53. Tothill, R.W.; Li, J.; Mileschkin, L.; Doig, K.; Siganakis, T.; Cowin, P.; Fellowes, A.; Semple, T.; Fox, S.; Byron, K.; et al. Massively-Parallel Sequencing Assists

- the Diagnosis and Guided Treatment of Cancers of Unknown Primary. *The Journal of Pathology* **2013**, 231, 413–423, doi:10.1002/path.4251.
54. Mandelker, D.; Dal Cin, P.; Jacene, H.A.; Armand, P.; Stone, R.M.; Lindeman, N.I. Refractory Myeloid Sarcoma with a FIP1L1-PDGFR $\alpha$  Rearrangement Detected by Clinical High Throughput Somatic Sequencing. *Exp Hematol Oncol* **2015**, 4, 30, doi:10.1186/s40164-015-0026-x.
  55. Doyle, L.A.; Wong, K.-K.; Bueno, R.; Dal Cin, P.; Fletcher, J.A.; Sholl, L.M.; Kuo, F. Ewing Sarcoma Mimicking Atypical Carcinoid Tumor: Detection of Unexpected Genomic Alterations Demonstrates the Use of next Generation Sequencing as a Diagnostic Tool. *Cancer Genet* **2014**, 207, 335–339, doi:10.1016/j.cancergen.2014.08.004.
  56. Perou, C.M.; Sørlie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Rees, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslen, L.A.; et al. Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* **2000**, 406, 747–752, doi:10.1038/35021093.
  57. Sørlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 10869–10874, doi:10.1073/pnas.191367098.
  58. Weigelt, B.; Baehner, F.L.; Reis-Filho, J.S. The Contribution of Gene Expression Profiling to Breast Cancer Classification, Prognostication and Prediction: A Retrospective of the Last Decade. *J Pathol* **2010**, 220, 263–280, doi:10.1002/path.2648.
  59. Gaudet, M.M.; Gierach, G.L.; Carter, B.D.; Luo, J.; Milne, R.L.; Weiderpass, E.; Giles, G.G.; Tamimi, R.M.; Eliassen, A.H.; Rosner, B.; et al. Pooled Analysis of Nine Cohorts Reveals Breast Cancer Risk Factors by Tumor Molecular Subtype. *Cancer Res* **2018**, 78, 6011–6021, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0502.
  60. Cancer Genome Atlas Research Network; Kandoth, C.; Schultz, N.; Cherniack, A.D.; Akbani, R.; Liu, Y.; Shen, H.; Robertson, A.G.; Pashtan, I.; Shen, R.; et al. Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma. *Nature* **2013**, 497, 67–73, doi:10.1038/nature12113.
  61. Inamura, K. Prostatic Cancers: Understanding Their Molecular Pathology and the 2016 WHO Classification. *Oncotarget* **2018**, 9, 14723–14737, doi:10.18632/oncotarget.24515.

62. Jass, J.R. Classification of Colorectal Cancer Based on Correlation of Clinical, Morphological and Molecular Features. *Histopathology* **2007**, *50*, 113–130, doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x.
63. Weinstein, J.N.; Akbani, R.; Broom, B.M.; Wang, W.; Verhaak, R.G.W.; McConkey, D.; Lerner, S.; Morgan, M.; Creighton, C.J.; Smith, C.; et al. Comprehensive Molecular Characterization of Urothelial Bladder Carcinoma. *Nature* **2014**, *507*, 315–322, doi:10.1038/nature12965.
64. Schwarzova, L.; Varchulova Novakova, Z.; Danisovic, L.; Ziaran, S. Molecular Classification of Urothelial Bladder Carcinoma. *Mol Biol Rep* **2023**, *50*, 7867–7877, doi:10.1007/s11033-023-08689-7.
65. Wang, Q.; Liu, G.; Hu, C. Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology Res* **2019**, *12*, 275–282, doi:10.14740/gr1187.
66. Ruiz-Cordero, R.; Ma, J.; Khanna, A.; Lyons, G.; Rinsurongkawong, W.; Bassett, R.; Guo, M.; Routbort, M.J.; Zhang, J.; Skoulidis, F.; et al. Simplified Molecular Classification of Lung Adenocarcinomas Based on EGFR, KRAS, and TP53 Mutations. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 83, doi:10.1186/s12885-020-6579-z.
67. Friend, S.H.; Bernards, R.; Rogelj, S.; Weinberg, R.A.; Rapaport, J.M.; Albert, D.M.; Dryja, T.P. A Human DNA Segment with Properties of the Gene That Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma. *Nature* **1986**, *323*, 643–646, doi:10.1038/323643a0.
68. Garber, J.E.; Offit, K. Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 276–292, doi:10.1200/JCO.2005.10.042.
69. Stadler, Z.K.; Schrader, K.A.; Vijai, J.; Robson, M.E.; Offit, K. Cancer Genomics and Inherited Risk. *J Clin Oncol* **2014**, *32*, 687–698, doi:10.1200/JCO.2013.49.7271.
70. Robson, M.E.; Bradbury, A.R.; Arun, B.; Domchek, S.M.; Ford, J.M.; Hampel, H.L.; Lipkin, S.M.; Syngal, S.; Wollins, D.S.; Lindor, N.M. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol* **2015**, *33*, 3660–3667, doi:10.1200/JCO.2015.63.0996.
71. Roa, B.B.; Boyd, A.A.; Volcik, K.; Richards, C.S. Ashkenazi Jewish Population Frequencies for Common Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* **1996**, *14*, 185–187, doi:10.1038/ng1096-185.

72. Górski, B.; Jakubowska, A.; Huzarski, T.; Byrski, T.; Gronwald, J.; Grzybowska, E.; Mackiewicz, A.; Stawicka, M.; Bebenek, M.; Sorokin, D.; et al. A High Proportion of Founder BRCA1 Mutations in Polish Breast Cancer Families. *Int J Cancer* **2004**, *110*, 683–686, doi:10.1002/ijc.20162.
73. Lubinski, J.; Korzen, M.; Gorski, B.; Cybulski, C.; Debniak, T.; Jakubowska, A.; Medrek, K.; Matyjasik, J.; Huzarski, T.; Byrski, T.; et al. Breast Cancer Susceptibility Genes. *J BUON* **2007**, *12 Suppl 1*, S23-29.
74. Cybulski, C.; Kluźniak, W.; Huzarski, T.; Wokołorczyk, D.; Kashyap, A.; Rusak, B.; Stempa, K.; Gronwald, J.; Szymiczek, A.; Bagherzadeh, M.; et al. The Spectrum of Mutations Predisposing to Familial Breast Cancer in Poland. *Int J Cancer* **2019**, *145*, 3311–3320, doi:10.1002/ijc.32492.
75. Górski, B.; Lubiński, J. BRCA1 Testing. *Hered Cancer Clin Pract* **2008**, *6*, 81–82, doi:10.1186/1897-4287-6-2-81.
76. Thavaneswaran, S.; Rath, E.; Tucker, K.; Joshua, A.M.; Hess, D.; Pinease, M.; Ballinger, M.L.; Thomas, D.M. Therapeutic Implications of Germline Genetic Findings in Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2019**, *16*, 386–396, doi:10.1038/s41571-019-0179-3.
77. Mandelker, D.; Ceyhan-Birsoy, O. Evolving Significance of Tumor-Normal Sequencing in Cancer Care. *Trends Cancer* **2020**, *6*, 31–39, doi:10.1016/j.trecan.2019.11.006.
78. Liu, Y.L.; Stadler, Z.K. The Future of Parallel Tumor and Germline Genetic Testing: Is There a Role for All Patients With Cancer? *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* **2021**, *19*, 871–878, doi:10.6004/jnccn.2021.7044.
79. Lincoln, S.E.; Nussbaum, R.L.; Kurian, A.W.; Nielsen, S.M.; Das, K.; Michalski, S.; Yang, S.; Ngo, N.; Blanco, A.; Esplin, E.D. Yield and Utility of Germline Testing Following Tumor Sequencing in Patients With Cancer. *JAMA Network Open* **2020**, *3*, e2019452, doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.19452.
80. Trottier, A.M.; Cavalcante de Andrade Silva, M.; Li, Z.; Godley, L.A. Somatic Mutation Panels: Time to Clear Their Names. *Cancer Genet* **2019**, *235–236*, 84–92, doi:10.1016/j.cancergen.2019.04.065.
81. Mandelker, D. Toward Concurrent Testing for Somatic and Germline Variants in Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **2016**, *22*, 3987–3988, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1043.

82. Norum, J.; Grindedal, E.M.; Heramb, C.; Karsrud, I.; Ariansen, S.L.; Undlien, D.E.; Schlichting, E.; Mæhle, L. *BRCA* Mutation Carrier Detection. A Model-Based Cost-Effectiveness Analysis Comparing the Traditional Family History Approach and the Testing of All Patients with Breast Cancer. *ESMO Open* **2018**, *3*, e000328, doi:10.1136/esmoopen-2018-000328.
83. Daly, M.B.; Pilarski, R.; Yurgelun, M.B.; Berry, M.P.; Buys, S.S.; Dickson, P.; Domchek, S.M.; Elkhany, A.; Friedman, S.; Garber, J.E.; et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020. *J Natl Compr Canc Netw* **2020**, *18*, 380–391, doi:10.6004/jnccn.2020.0017.
84. Schaeffer, E.M.; Srinivas, S.; Adra, N.; An, Y.; Barocas, D.; Bitting, R.; Bryce, A.; Chapin, B.; Cheng, H.H.; D'Amico, A.V.; et al. Prostate Cancer, Version 4.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* **2023**, *21*, 1067–1096, doi:10.6004/jnccn.2023.0050.
85. Weiss, J.M.; Gupta, S.; Burke, C.A.; Axell, L.; Chen, L.-M.; Chung, D.C.; Clayback, K.M.; Dallas, S.; Felder, S.; Gbolahan, O.; et al. NCCN Guidelines® Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal, Version 1.2021. *J Natl Compr Canc Netw* **2021**, *19*, 1122–1132, doi:10.1164/jnccn.2021.0048.
86. Babjuk, M.; Burger, M.; Capoun, O.; Cohen, D.; Compérat, E.M.; Dominguez Escrig, J.L.; Gontero, P.; Liedberg, F.; Masson-Lecomte, A.; Mostafid, A.H.; et al. European Association of Urology Guidelines on Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol* **2022**, *81*, 75–94, doi:10.1016/j.eururo.2021.08.010.
87. *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; Rosenthal, D.L., Wojcik, E.M., Kurtycz, D.F.I., Eds.; Springer International Publishing, 2016; ISBN 978-3-319-22863-1.
88. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Winckler, W.; Guttman, M.; Lander, E.S.; Getz, G.; Mesirov, J.P. Integrative Genomics Viewer. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 24–26, doi:10.1038/nbt.1754.
89. Koboldt, D.C.; Chen, K.; Wylie, T.; Larson, D.E.; McLellan, M.D.; Mardis, E.R.; Weinstock, G.M.; Wilson, R.K.; Ding, L. VarScan: Variant Detection in Massively Parallel Sequencing of Individual and Pooled Samples. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2283–2285, doi:10.1093/bioinformatics/btp373.

90. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
91. Rausch, T.; Zichner, T.; Schlattl, A.; Stütz, A.M.; Benes, V.; Korbel, J.O. DELLY: Structural Variant Discovery by Integrated Paired-End and Split-Read Analysis. *Bioinformatics* **2012**, *28*, i333–i339, doi:10.1093/bioinformatics/bts378.
92. Ramírez, F.; Ryan, D.P.; Grüning, B.; Bhardwaj, V.; Kilpert, F.; Richter, A.S.; Heyne, S.; Dündar, F.; Manke, T. deepTools2: A next Generation Web Server for Deep-Sequencing Data Analysis. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, W160–W165, doi:10.1093/nar/gkw257.
93. Krzywinski, M.; Schein, J.; Birol, I.; Connors, J.; Gascoyne, R.; Horsman, D.; Jones, S.J.; Marra, M.A. Circos: An Information Aesthetic for Comparative Genomics. *Genome Res.* **2009**, *19*, 1639–1645, doi:10.1101/gr.092759.109.
94. McConkey, D.J.; Lee, S.; Choi, W.; Tran, M.; Majewski, T.; Lee, S.; Siefker-Radtke, A.; Dinney, C.; Czerniak, B. Molecular Genetics of Bladder Cancer: Emerging Mechanisms of Tumor Initiation and Progression. *Urol Oncol* **2010**, *28*, 429–440, doi:10.1016/j.urolonc.2010.04.008.
95. Hopman, A.H.N.; Kamps, M.A.F.; Speel, E.J.M.; Schapers, R.F.M.; Sauter, G.; Ramaekers, F.C.S. Identification of Chromosome 9 Alterations and P53 Accumulation in Isolated Carcinoma in Situ of the Urinary Bladder versus Carcinoma in Situ Associated with Carcinoma. *Am J Pathol* **2002**, *161*, 1119–1125, doi:10.1016/S0002-9440(10)64388-X.
96. Dulaimi, E.; Uzzo, R.G.; Greenberg, R.E.; Al-Saleem, T.; Cairns, P. Detection of Bladder Cancer in Urine by a Tumor Suppressor Gene Hypermethylation Panel. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 1887–1893.
97. Williamson, M.P.; Elder, P.A.; Shaw, M.E.; Devlin, J.; Knowles, M.A. P16 (CDKN2) Is a Major Deletion Target at 9p21 in Bladder Cancer. *Hum Mol Genet* **1995**, *4*, 1569–1577.
98. Stadler, W.M.; Sherman, J.; Bohlander, S.K.; Roulston, D.; Dreyling, M.; Rukstalis, D.; Olopade, O.I. Homozygous Deletions within Chromosomal Bands 9p21-22 in Bladder Cancer. *Cancer Res* **1994**, *54*, 2060–2063.
99. Kaluzewski, T.; Morzuch, L.; Jedrzejczyk, A.; Marks, P.; Rozniecki, M.; Bednarek, M. Advantages of Fluorescence in Situ Hybridisation Technique in

- Urothelial Carcinogenesis Identification. Retrospective Evaluation of 512 Urovysion Test Results. *MEDtube Science* **2018**, 7.
100. Choi, W.; Porten, S.; Kim, S.; Willis, D.; Plimack, E.R.; Hoffman-Censits, J.; Roth, B.; Cheng, T.; Tran, M.; Lee, I.-L.; et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* **2014**, 25, 152–165, doi:10.1016/j.ccr.2014.01.009.
  101. Allory, Y.; Beukers, W.; Sagrera, A.; Flández, M.; Marqués, M.; Márquez, M.; van der Keur, K.A.; Dyrskjot, L.; Lurkin, I.; Vermeij, M.; et al. Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations in Bladder Cancer: High Frequency across Stages, Detection in Urine, and Lack of Association with Outcome. *Eur Urol* **2014**, 65, 360–366, doi:10.1016/j.eururo.2013.08.052.
  102. Borah, S.; Xi, L.; Zaug, A.J.; Powell, N.M.; Dancik, G.M.; Cohen, S.B.; Costello, J.C.; Theodorescu, D.; Cech, T.R. Cancer. TERT Promoter Mutations and Telomerase Reactivation in Urothelial Cancer. *Science* **2015**, 347, 1006–1010, doi:10.1126/science.1260200.
  103. Rachakonda, P.S.; Hosen, I.; de Verdier, P.J.; Fallah, M.; Heidenreich, B.; Ryk, C.; Wiklund, N.P.; Steineck, G.; Schadendorf, D.; Hemminki, K.; et al. TERT Promoter Mutations in Bladder Cancer Affect Patient Survival and Disease Recurrence through Modification by a Common Polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, 110, 17426–17431, doi:10.1073/pnas.1310522110.
  104. Kinde, I.; Munari, E.; Faraj, S.F.; Hruban, R.H.; Schoenberg, M.; Bivalacqua, T.; Allaf, M.; Springer, S.; Wang, Y.; Diaz, L.A.; et al. TERT Promoter Mutations Occur Early in Urothelial Neoplasia and Are Biomarkers of Early Disease and Disease Recurrence in Urine. *Cancer Res* **2013**, 73, 7162–7167, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2498.
  105. Hosen, M.I.; Sheikh, M.; Zvereva, M.; Scelo, G.; Forey, N.; Durand, G.; Voegelé, C.; Poustchi, H.; Khoshnia, M.; Roshandel, G.; et al. Urinary TERT Promoter Mutations Are Detectable up to 10 Years Prior to Clinical Diagnosis of Bladder Cancer: Evidence from the Golestan Cohort Study. *EBioMedicine* **2020**, 53, 102643, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102643.
  106. Berry, S.J.; Coffey, D.S.; Walsh, P.C.; Ewing, L.L. The Development of Human Benign Prostatic Hyperplasia with Age. *J Urol* **1984**, 132, 474–479, doi:10.1016/s0022-5347(17)49698-4.



107. Bladder Cancer Incidence Statistics Available online:  
<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bladder-cancer/incidence> (accessed on 30 August 2024).
108. Daneshmand, S.; Bazargani, S.T.; Bivalacqua, T.J.; Holzbeierlein, J.M.; Willard, B.; Taylor, J.M.; Liao, J.C.; Pohar, K.; Tierney, J.; Konety, B.; et al. Blue Light Cystoscopy for the Diagnosis of Bladder Cancer: Results from the US Prospective Multicenter Registry. *Urol Oncol* **2018**, *36*, 361.e1-361.e6, doi:10.1016/j.urolonc.2018.04.013.