

Molekulární patogeneze testikulárních germinálních nádorů

Molecular Pathogenesis of Testicular Germ Cell Tumors

Bakardjjeva-Mihaylova V.¹, Škvárová Kramaržová K.¹, Slámová M.¹, Büchler T.², Boublíková L.^{1,2}

¹ CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

² Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerova nemocnice, Praha

Souhrn

Východiska: Testikulární germinální nádory (testicular germ cell tumors – TGCT) jsou nejčastější solidní malignitou mladých mužů, se zvyšující se incidencí v posledních desetiletích. V jejich etiologii se uplatňuje kombinace faktorů vnějšího prostředí i genetických predispozic z oblastí několika genomových lokusů, postihujících jak testikulární germinální buňky, tak buňky stromální a jejich interakce v rámci daného mikroprostředí. Patogeneze TGCT začíná již v prenatálním období zablokováním vývoje primordiálních germinálních buněk a pokračuje postnatálně přes *in situ* nádorovou lézi k invazivnímu tumoru s charakteristickou amplifikací krátkého raménka chromozomu 12. Kromě genů lokalizovaných zde se v patogenezi TGCT uplatňují další molekulární mechanismy jako aktivace dráhy KIT/KITL, aberace v genech účastnících se oprav poškozené DNA a regulujících diferenciaci, proliferaci a přežívání buněk. I přes poměrně dobrou prognózu a relativně známou etiopatogenezi těchto nádorů se u nich neuplatňuje žádná biologická léčba ani žádné molekulárně-genetické prediktivní či prognostické faktory. Nedostatek informací se vztahuje především ke konkrétním molekulárním drahám zapojeným do vzniku TGCT, na jejichž složky by bylo možné biologickou léčbou cíleně působit. Současné vysokokapacitní technologie jako sekvenování nové generace na exomové i transkriptomové úrovni by měly doplnit chybějící informace o genetických predispozicích vzniku TGCT a dalších faktorech zodpovědných za jejich klinický průběh a odpověď na léčbu. **Cíl:** V tomto přehledu jsou shrnuty hlavní dosud známé molekulární charakteristiky TGCT a pravděpodobné mechanismy účastnící se jejich vzniku a progresu.

Klíčová slova

testikulární germinální nádory – signální dráhy – molekulární aberace – prediktivní faktory – prognostické faktory

Práce byla realizovaná za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy NPU I nr.LO1604.

The work was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports NPU I nr.LO1604.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Violeta Bakardjjeva-Mihaylova
CLIP, Klinika dětské hematologie
a onkologie
2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
e-mail: vbmihaylova@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 20. 3. 2017

Přijato/Accepted: 23. 7. 2017

doi: 10.14735/amko2017412

Summary

Background: Testicular germ cell tumors (TGCT) are the most frequently diagnosed solid tumors in young men and their incidence has been increasing over the past decades. Several factors may combine and play a role in the TGCT etiology, including environmental factors and genetic predispositions at multiple genomic loci that affect both testicular germ cells and stromal cells, and their interactions within the testicular micro-environment. The pathogenesis of TGCT starts prenatally with primordial germ cell arrest, and further proceeds postnatally, giving rise to *in situ* germ cell neoplasia and, finally, to invasive TGCT with the characteristic 12p chromosome amplification. Apart from the genes localized here, further molecular mechanisms have been linked to TGCT pathogenesis, such as the activation of the KIT/KITL signaling pathway, and aberrations in genes involved in DNA reparation, regulation of cellular differentiation, proliferation, and survival. Despite the relatively good prognosis and known etiopathogenesis of these tumors, neither targeted therapy nor molecular prognostic/predictive factors have yet been implemented in the management of TGCT, because there is not enough information about the molecular pathways or molecules involved in TGCT development that could be used for patient stratification and treatment. Current high-throughput technologies, such as next generation sequencing at the exome or transcriptome level could provide this missing information on genetic predispositions and other factors influencing the clinical course of the disease and treatment response in TGCT. **Aim:** In this review, we summarize the main molecular characteristics of TGCT and the probable mechanisms participating in tumor initiation and progression.

Key words

testicular germ cell tumors – signaling pathways – molecular aberrations – predictive factors – prognostic factors

Úvod

Testikulární germinální nádory (testicular germ cell tumors – TGCT) jsou nejčastější nádory ve věkové skupině 15–45 let a tvoří asi 1 % všech nádorů u mužů. Jejich incidence stoupá v posledních 40 letech. V nedávných studiích byl zaznamenán asi 75% vzestup výskytu TGCT z 2,9/100 000 v roce 1975 na 5,2/100 000 v roce 2014, přičemž důvody této zvýšené incidence nejsou známy [1–3]. Incidence TGCT se liší významně mezi různými etniky, vysoký výskyt tohoto nádoru je u Evropanů a mezi obyvateli USA s evropským původem. Nejvyšší počet TGCT je diagnostikován v Dánsku (15,4 případů na

100 000 obyvatel), následovaném Švédskem a Norskem, které mají zhruba dvojnásobnou incidenci tohoto typu nádoru v porovnání se sousedním Finskem. To společně s faktem zvýšeného výskytu TGCT u druhé generace finských migrantů žijících ve Švédsku může indikovat existenci faktorů vnějšího prostředí zapojených ve vzniku TGCT. Současně je u TGCT dokumentována nejvyšší míra familiární predispozice ze všech známých nádorů. Obě tyto skutečnosti činí obtížné při identifikaci konkrétních genů, které by byly zodpovědné za zvýšenou incidenci TGCT [4–7].

Významná část (90 %) TGCT velice dobře reaguje na léčbu cisplatinou, sou-

časně ale zhruba 10 % mužů s pokročilým onemocněním na tento nádor umírá, většinou kvůli rozvoji rezistence na tuto chemoterapii. Proto je TGCT nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění u mužů v dané věkové skupině [8,9].

Dle klinických, epidemiologických a histologických kritérií lze TGCT dělit do tří skupin – 1. teratomy a nádory ze žloutkového váčku pediatrických pacientů; 2. TGCT (seminomy i neseminomy) postpubertálních pacientů; 3. spermatocytické seminomy, které vznikají v pozdějším věku (tab. 1) [10]. Tento přehled se dále věnuje druhé skupině TGCT, které tvoří 98 % všech neoplazií vznikajících v testikulární tkáni.

Tab. 1. Základní charakteristiky TGCT. Převzato a upraveno podle [9].

Věk	Histologie	Incidence na 100 000 obyvatel	Genetické abnormality	Ploidita	Rizikové faktory
prepubertální	teratomy nádory ze žloutkového váčku	0,12	1p, 6q	diploidní aneuploidní	etnický původ, genetické/rodinné predispozice, infertilita, kryptorchismus, dysgeneze pohlavních orgánů, androgenní insenzitivita
postpubertální	seminomy neseminomy	6,0	GCNIS i (12p)	GCNIS • hypertriploidní seminomy • hypertriploidní neseminomy • hypotriploidní	
starší 40 let	spermatocytární seminomy	0,2	+9	tetraploidní/ diploidní	

GCNIS – testikulární germinální neoplazie *in situ*, TGCT – testikulární germinální nádory

Predispoziční a etiologické faktory vzniku TGCT

Stejně jako při vzniku jiných nádorů se i u TGCT předpokládá interakce genetických predispozic a faktorů vnějšího prostředí. U této malignity se velice pravděpodobně uplatňuje větší množství genů nacházejících se v různých místech genomu. K těmto genetickým predispozicím se přidává účinek vícero faktorů vnějšího prostředí i abnormální signalizace z mikroprostředí varlete v místě vznika-jícího tumoru [11]. Ke známým hereditárním rizikovým faktorům patří výskyt tohoto typu nádoru u rodinných příslušníků, kdy riziko vzniku TGCT pro syny postižených mužů je 4–6× vyšší a pro jejich bratry 8–10× vyšší oproti populačnímu riziku [12]. Předpokládá se recesivní typ dědičnosti nebo existence predispozičního lokusu na X chromozomu, konkrétně Xq27, s ohledem na vyšší riziko vzniku TGCT u bratra postiženého než u syna postiženého otce [13,14]. Mezi další rizikové události podmiňující vznik TGCT patří kryptorchismus, snížená fertilita, různé genetické poruchy a syndromy spojené s dysgenézí pohlavních orgánů. V poslední době se předpokládá, že TGCT vznikají prakticky vždy ve varleti postiženém různým stupněm v rámci tzv. syndromu testikulární dysgenese (TDS). Tento syndrom je charakterizovaný souborem příznaků, které jsou důsledkem poruchy vývoje varlete a zahrnují vývojové vady jako kryptorchismus nebo hypospadii, sub- nebo infertilitu při nízkém počtu či kvalitě spermií, a vyšší frekvenci výskytu TGCT. Vznik příznaků hodnocených jako TDS je kombinací vlivu faktorů vnějšího prostředí a genetické predispozice a jejich vzájemné interakce [15,16]. V souvislosti s faktory vnějšího prostředí a vznikem TGCT se prokazuje jako důležitá korelace mezi zvýšenou prenatální expozicí estrogenům (zvýšená hladina estradiolu a androstendionu u matek) a častějším výskytem TGCT u potomstva [17]. Dalším zkoumaným mechanismem při vzniku TGCT je narušený poměr mezi estrogeny a androgenními hormonálními hladinami, jakožto i polymorfizmy v genech účastnících se metabolismu steroidních hormonů. Byla pozorována souvislost mezi častějším vznikem TGCT

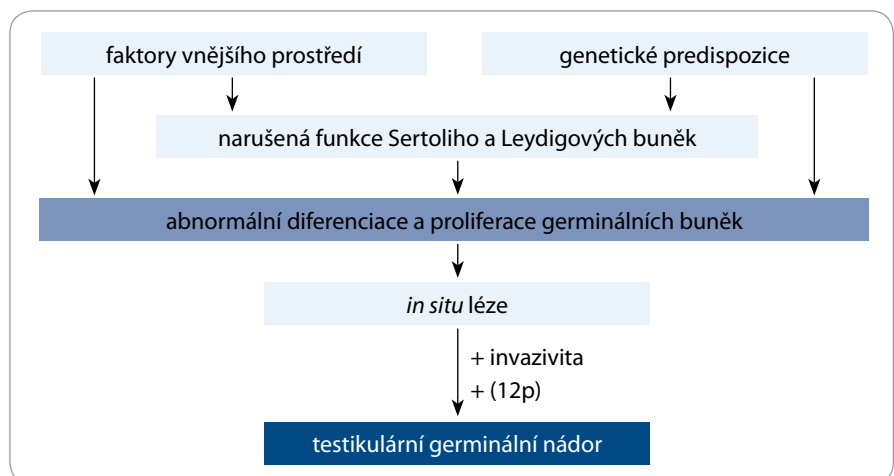


Schéma 1. Vývoj TGCT a faktory na něm se podílející.

TGCT – testikulární germinální nádor

a změněnou funkcí receptoru pro androgenní hormony související s polymorfizmy v genu pro tento receptor, a také snížený výskyt TGCT u určitých heterozygotních polymorfizmů v genu pro LHR (luteinizing hormone receptor) [18,19]. Jedním z hlavních rizikových faktorů podílejících se na vzniku TGCT je předchozí diagnóza nádoru v druhém varleti. U případů diagnostikovaného TGCT je riziko vzniku stejného nádoru v druhém varleti 26× vyšší než populační riziko. Většina kontralaterálních nádorů je seminomového typu a riziko vzniku druhého nádoru přetrvává až po dobu 25 let od nálezu první malignity [20–22].

Testikulární tkáň patří k imunoprivilegovaným místům v organismu. Obvyklou událostí u TGCT je infiltrace těchto nádorů buňkami imunitního systému, i když jejich funkce není u TGCT dobře objasněná. Hlavními buněčnými typy v TGCT infiltrátech jsou makrofágy, CD8+ a CD45R0+ T lymfocyty. Skladba imunitních buněk u TGCT se nijak neliší od normální testikulární tkáně, což nasvědčuje spíše tomu, že u tohoto typu nádoru neexistuje imunitní dohled [23,24]. U seminomů nebyla zjištěna korelace mezi hustotou tumor-infiltrujících lymfocytů (TILs) a apoptotickým indexem, u neseminomů byla tato korelace zjištěna jen pro metastatický embryonální karcinom [25]. Hustota TILs není ani nezávislým prognostickým faktorem pro relaps seminomu [26]. Navzdory tomu, že velká skupina antigenů asociovaných

s nádorem se nazývá cancer-testis antigeny, jejich význam u TGCT je nejasný a TILs proti nim nemají specifitu [27]. Cancer-testis antigeny se nacházejí u 3 % (CTAG1B), 10 % (GAGE1, MAGEA4), 33 % (MAGEA3) a 40 % (MAGEC1) klasických seminomů, ale ne u neseminomových nádorů. Nejvyšší exprese cancer-testis antigenů je u spermatocytického seminomu [28]. Expresse koinhibiční molekuly programmed death ligand 1 (PD-L1) je výrazně vyšší u TGCT ve srovnání s normální testikulární tkání. Nejvyšší expresi PD-L1 vykazují choriokarcinomy následované embryonálním karcinomem, teratomem, nádorem ze žloutkového váčku a seminomem. Vysoká exprese PD-L1 je spojena se špatnou prognózou [29].

K získání invazivity a pro přechod od *in situ* neoplazie k invazivnímu tumoru je nutná interakce nádorových buněk s alterovaným prostředím tvořeným podpůrnými buňkami – Sertoliho a Leydigovými. Tyto produkují do okolí testikulárních germinálních buněk mimo jiné inzulinu podobné růstové faktory (IGF-I a IGF-II) podmiňující buněčný růst a diferenciaci. Zvýšená hladina těchto růstových faktorů způsobuje zvýšení hladiny enzymů remodelujících extracelulární matrix v okolí nádorů, podporuje migraci i proliferaci nádorových buněk i jejich rezistenci k apoptóze. Všechny tyto jevy jsou klíčové pro vznik metastáz a agresivní růst TGCT [30].

Vznik a vývoj TGCT

TGCT vznikají maligní transformací testikulárních germinálních buněk, proces zahrnuje několik kroků, které vedou k akumulaci aberací v genech regulujících diferenciaci, proliferaci a přežívání buněk (schéma 1) [31]. Iniciální kroky této nádorové transformace pravděpodobně probíhají už v prenatálním období. V současné době se má za to, že TGCT vznikají z primordiálních germinálních buněk (primordial germinal cells – PGC), které jsou zablokované ve svém vývoji. Diskutabilní otázkou zůstává, zda maligní transformace zodpovědná za vývoj TGCT nastává před nebo po vycesťování PGC ze žlutkového vřetka do genitálních lišt. Z posledních výzkumů bilaterální TGCT vyplývá, že u těchto nádorů neexistuje jedna společná původní mutace [32]. Proto se předpokládá, že při vzniku TGCT se uplatňují různé aberace ve více genech, které nastávají až po migraci PGC do genitálních lišt. Existují však i dřívější práce ukazující na výskyt jednobázové mutace v kodonu 816 v genu *KIT* s velmi vysokým výskytem (98 %) u bilaterálních nádorů oproti unilaterálním TGCT (1,3 %) [33].

Postnatálně pokračuje maligní transformace a postupně dochází ke vzniku prekursorové *in situ* léze – testikulární germinální neoplazie *in situ* (testicular germ cell neoplasia *in situ* – GCNIS, dříve nazývané intratubulární nespecifikovaná neoplazie z germinálních buněk – ITGCNU) [34,35]. Přibližně 90 % všech TGCT je asociováno s přítomností GCNIS, která znamená 50% riziko vzniku TGCT v časovém horizontu 5 let [16]. Další krok ve vývoji TGCT – získání invazivity a plně maligního charakteru – nastává po pubertě, což nasvědčuje faktu, že tento druh nádoru je hormonálně ovlivněn.

Jak se z dat získaných z genetických analýz vzorků TGCT ukazuje, je pro vývoj tohoto typu nádoru nezbytná existence izochromozomu i(12p), který je tvořen krátkým raménkem tohoto chromozomu či duplikací oblasti 12p. Zisk této aberace je spojován spíše se vznikem invazivního typu TGCT, jelikož zisk 12p není pozorován u GCNIS. Důsledkem je amplifikace genů nacházejících se na chromozomu 12p (např. *SOX5*, *CCND5* a *KRAS*), které patrně hrají zásadní roli při vzniku

TGCT. Předpokládá se, že cyklin D kódovaný genem *CCND5*, jehož aberantní exprese byla prokázána u TGCT, je jeden z řídicích signálů ve vývoji tohoto typu nádoru. Zvýšená exprese *CCND5* je pravděpodobně potřebná pro vstup diferencovaných buněk do buněčného cyklu, což vede ke genetické nestabilitě a vzniku polyploidizace [36–38].

Další typickou aberací nezbytnou pro vývoj TGCT je aktivace dráhy *KIT/KITL-G(SCF)*, která funguje v patogenezi TGCT jako dominantní signalizační dráha. Jde o signalizaci přes cytokinový receptor *KIT*, na který se naváže ligand pro tuto kinázu (*KITL/SCF*) a spustí signalizační kaskádu regulující proliferaci, migraci a přežívání hematopoetických buněk, melanocytů a germinálních buněk [39,40]. Somatické mutace a aberantní exprese genu *KIT* byly detekovány u mnoha nádorových onemocnění vč. testikulárních nádorů [41,42]. Amplifikace genomového úseku 4q12 obsahujícího *KIT* je obecně asociovaná se vznikem seminomů, naproti tomu delece v 12q22 jsou typické pro neseminomy [43]. Ve studiích zabývajících se používáním inhibitoru *KIT* signalizace (imatinibu) došlo k signifikantnímu snížení této signalizace u seminomů s overexprimovaným *KIT* receptorem [44]. Další možný mechanismus předpokládá vznik mutace v genu pro *KITL*, která způsobí změnu v interakci tohoto proteinu s p53, a tím i jeho zvýšenou expresi, jež podporuje proliferaci takto alterovaných buněk a jejich tumorogenicitu i v přítomnosti normálních hladin nemutovaného p53 [45]. Aktivační mutace *KITL/SCF* je charakterizovaná jako vedoucí událost při vzniku TGCT [46].

Z poznatků genome-wide association studies (GWAS) je patrné, že zhruba za 15 % genetické predispozice vzniku nádoru tohoto druhu jsou zodpovědné tzv. SNPs (single nucleotide polymorphisms) – jednonukleotidové polymorfismy či jednobázové mutace, které byly identifikovány v různých genových lokusech [47]. Byly identifikovány v genu již zmíněného *KITL/SCF* a dalších genech – v genu pro známý inhibitor apoptózy *BAK1*; v genu *DMRT1* zodpovědném za diferenciaci testikulárních buněk, *SPRY4*, který společně s *BAK1* ovlivňuje

signalizační dráhu *KIT/KITL*. Podle dalších genetických analýz byly zjištěny homozygotní delece v několika tumor-supresorových genech jako *RB1*, *NME*, *WT1*, *APC* a *CDKN2A*, bohužel tyto výsledky nebyly potvrzeny dalšími funkčními studii [36,48].

Jak z nejnovějších výsledků plyne, u TGCT pravděpodobně mnohem častěji než u jiných nádorů nastává ztráta genové informace jedné z rodičovských alel, která je následovaná duplikací genomového úseku pouze z druhé zbylé alely. Tato reciproká ztráta heterozygoty je u TGCT mnohem častější událostí než u jiných nádorů [49].

Typické molekulárně-genetické aberace u TGCT

Charakteristické vlastnosti a biologická povaha TGCT jsou podmíněny přítomností různých molekulárně-genetických aberací a změněnou buněčnou signalizací. Jak již bylo zmíněno, hlavní a pravděpodobně počáteční změnou vedoucí ke vzniku invazivního typu TGCT je zisk izochromozomu i(12p) s amplifikací genů zde lokalizovaných. Kromě genů zodpovědných za buněčnou proliferaci dochází i k aktivaci tzv. kmenových genů zodpovědných za pluripotenci buněk TGCT. V daném duplikovaném úseku genomu se nachází gen *NANOG*, jehož zvýšená exprese pravděpodobně vede i k zvýšení exprese dalších genů typických pro pluripotentní buňky – genů *SOX2* a *POU1/Oct4*. Takto alterované buňky pak dávají vznik nádorům, které jsou extrémně citlivé na léčbu cisplatinou. Dokládají to i studie poukazující na sníženou senzitivitu na léčbu cisplatinou po ztrátě markerů pluripotence, např. snížené expresi *POU5F1/Oct4* [50].

Zatímco nejčastěji mutovaným genem u lidských solidních nádorů je *TP53*, jehož mutovanost dosahuje 50 % napříč všemi druhy malignit, u testikulárních nádorů se uvádí jen asi 3% hladina mutovaného *TP53*. Mutace v genu *TP53* jsou tedy podle dosavadních studií u TGCT vzácné a častější u chemorezistentních nádorů, ačkoli není jasné, zda je tato mutace podstatná pro vznik chemorezistence [51]. U TGCT byla ale překvapivě zjištěna vysoká hladina nemutovaného p53 proteinu, která je patrně zodpovědná za

přednostní aktivaci apoptotických drah po expozici genotoxickým látkám, jako je cisplatina [52,53]. Tento jev je výsledkem změnéné signalizace a/nebo metabolismu p53 v důsledku zvýšené potřeby kontroly poškození DNA v primordiálních germinálních buňkách – prekurzorech TGCT [54,55]. V současnosti se uvažuje i o možném zapojení mitogenem aktivované proteinkinázy 15 (MAPK15) v regulaci buněčné odpovědi TGCT na genotoxický stres. V recentně publikované studii byla zjištěna zvýšená hladina této kinázy u seminomů, embryonálních karcinomů (embryonal carcinoma – EC) a buněčných linií EC. Pravděpodobně tato zvýšená exprese MAPK15 chrání buňky před akumulací reaktivních radikálů (reactive oxygen species – ROS) a brání vzniku poškození DNA, které by přes dráhu aktivace p53 vedlo k zastavení buněčného cyklu a apoptóze [56].

Zmíněná extrémní senzitivita TGCT na léčbu cisplatinou není dosud přesněji objasněná. Zdá se, že buňky TGCT mají značně sníženou expresi genů účastnících se reparační DNA, což způsobuje jejich mimořádnou senzitivitu k látkám poškozujícím DNA [57]. K této teorii ale existují studie podporující spíše existenci polymorfizmů v genech účastnících se reparační DNA, např. v genu *XRCC1* [58]. Další možnou cestou je již zmíněná asociace mezi mutovaným genem *TP53* a vznikem rezistence u TGCT [52], toto ale nebylo potvrzeno dalšími pracemi, kdy přítomnost mutovaného p53 byla nízká a neprokázala se souvislost s rezistencí [59,60]. Známým faktem je vztah mezi vyšší diferenciací buněk a stoupající rezistencí k cisplatině. Z toho plyne i skutečnost, že ztráta genů zodpovědných za udržení pluripotence (*NANOG*, *POU5F1/Oct4*, *SOX2*) detekovatelných u nejcitlivějšího typu TGCT – seminomů, ústí ve zvýšenou rezistenci na cisplatinu [38]. Stejných výsledků bylo dosaženo i při umělém navození diferenciaci vitaminem D, kdy docházelo ke snížení hladiny exprese genů zodpovědných za pluripotentní fenotyp, dále docházelo ke zvýšení rezistence na cisplatinu a zvýšení exprese proteinů regulujících buněčný cyklus (p21, p27) [61]. Z poznatků o expresi *POU5F1/Oct4*, hlavního faktoru ovlivňujícího pluripotenci,

je zřejmé, že funkce p53 není přímo ovlivněná tímto transkripčním faktorem. Zde se spíše uplatňuje mechanismus navození vyšší celkové citlivosti a extrémní pro-apoptotické odpovědi u buněk exprimujících *POU5F1/Oct4*, a to přes snížení hladiny exprese anti-apoptotických proteinů Noxa, Puma a Bim [62]. Při zkoumání anti-apoptotických proteinů nebyla nalezena zvýšená exprese žádného z členů Bcl-2 rodiny [63]. U TGCT byla opakovaně zjištěna zvýšená hladina intaktního p53 proteinu, významné změny v expresi byly ale nalezené u jiných faktorů, které jsou součástí p53 signální dráhy – p21 není u TGCT téměř exprimovaný a je jen velmi těžce detekovatelný, zato přímý inhibitor p53 onkogen MDM2 se zde nachází ve zvýšeném množství [64]. Tato vysoká exprese negativního regulátoru p53 může souviset s preferenční inaktivací dráhy vedoucí přes p53 u chemorezistentních TGCT [65].

S diferenciací buněk úzce souvisí i jejich stupeň metylace. U TGCT je zřejmá přímá souvislost mezi stupněm metylace a rezistence na cisplatinu. Nejlépe odpovídajícími nádory jsou seminomy, tvořené nediferencovanými buňkami s nejnižším stupněm metylace. Naproti tomu u nejvíce diferencovaných nese-minomových nádorů byl zjištěn vysoký stupeň metylace a rezistence na cisplatinu [66]. U nádorů rezistentních na terapii cisplatinou byla dále zkoumána přítomnost mikrosatelitů (krátké tandemové repetice (short tandem repeats – STR)) v osmi vybraných lokusech genomu, kdy se přítomnost těchto repetitivních vzorků a korelovala jak s mutací v genu *BRAF* (V600E), tak i s absencí proteinu hMLH1, který se účastní korekce párování bází (mismatch repair – MMR) [63]. Mutace v genu *BRAF* (V600E) byla zkoumána i v dalších pracích, kdy původní slibné výsledky ukazující na signifikantní korelaci mezi rezistencí na platinu a přítomností této aberace nebyly potvrzeny [67–69].

Další signalizační dráhou spojovanou s TGCT patogenezi je Nodal signalizace. Sekretorický protein Nodal je součástí TNF- β rodiny a účastní se buněčné diferenciaci během časně embryogene-

neze. Signalizace přes Nodal molekulu probíhá pouze v přítomnosti receptorové molekuly Cripto. Přechodná aktivovaná signalizace přes Nodal/Cripto je nutná pro sebeobnovu u embryonálních kmenových buněk a pro udržení pluripotence, jejich stálá aberantní aktivace však vede ke vzniku mnoha druhů nádorů (prsů, kůže, střeva) [70]. U germinálních buněk se tato signalizace podílí na udržení pluripotence a brání jejich předčasnou diferenciaci, u buněk TGCT je pozorovaná zvýšená aktivace Nodal/Cripto, stejně tak i u GCNIS, což podporuje teorii prenatálního vzniku těchto nádorů, a předpokládá se, že tato aktivace je dostatečná pro iniciaci vzniku GCNIS [71]. Zkrácením Cripto proteinu fosfolipázou vznikne biologicky aktivní forma, která podporuje migraci endoteliálních buněk a aktivuje signalizaci přes tuto molekulu bez nutnosti přítomné Nodal signalizace, proto se detekce této zkrácené formy Cripto proteinu zkoumá jako slibný diagnostický marker u některých solidních tumorů [72–74].

Obecně je známo, že TGCT mají nejnižší frekvenci mutací ze všech dospělých nádorů. Jejich mutační frekvence je podobná jako u pediatrických malignit, u nichž je častá přítomnost fúzních transkriptů. Z tohoto důvodu je i u TGCT zkoumána přítomnost fúzních genů, které by mohly být zodpovědné za maligní transformaci. TGCT byly v poslední době zkoumány pomocí sekvenování nové generace na úrovni RNA. Ve své práci Hoff et al popsali existenci osmi fúzních transkriptů a využití jednoho alternativního promotoru [75]. Dva z těchto fúzních genů (*RCC1-ABHD12B*, *CLEC6A-CLES4D*) a využití alternativního promotoru ETV6 nebyly nalezeny u nemaligních vzorků ani v žádné jiné tkáni organismu, proto se předpokládá jejich možná role při vzniku TGCT.

Potenciální klinické využití molekulárně-genetických aberací

V současné době se v primární diagnostice a predikci průběhu onemocnění používají u TGCT pouze klinické a běžné laboratorní ukazatele. Kromě histologického typu a klinického rozsahu nádoru se pro monitorování rozsahu onemocnění a celkové odpovědi

na léčbu využívají sérové markery – sérový α -fetoprotein (AFP), lidský choriový gonadotropin β (hCG β) a laktátdehydrogenáza (LDH). Zmíněné sérové ukazatele jsou zvýšené u 80 % ne seminomů a u 20 % seminomů [76,77]. Tyto však nejsou vždy spolehlivé, obzvláště u nádorů tvořených seminomovou složkou a u embryonálních karcinomů. Z tohoto důvodu v současné době existuje snaha o nalezení a ustanovení nových prediktivních a prognostických markerů. Jednou z možností je stanovení hladiny mikroRNA v séru, což se z posledních výsledků zdá být slibným prediktivním faktorem pro stanovení přítomnosti TGCT, a to jak seminomového, tak neseminomového původu [78]. Další alternativou je sledování přítomnosti zkrácené formy proteinu Cripto [79]. Ve své podstatě se všechny dosud zmíněné geny, u nichž dochází k aberacím, mohou použít jako prediktivní/prognostické markery, otázkou zůstává jejich robustnost a spolehlivost. Velké naděje byly vkládány do detekce aberací v dráze PI3K-AKT, jejíž složky jsou mutované u mnoha typů nádorů. V recentní publikaci byly nalezeny mutace v genech *AKT1* a *PIK3CA*, které tvoří základní proteinové složky této signální dráhy, u 28 % nádorů rezistentních na cisplatinu [68,80]. Dalším možným kandidátem je gen *WT1*. U TGCT byla zjištěna signifikantně snížená exprese tohoto genu u neseminomů a ještě výrazněji u seminomů. Změna se týkala také zastoupení jednotlivých izoforem *WT1*, kdy u TGCT docházelo k zvýšení exprese izoforem postrádajících exon 5. Gen *WT1* byl také mutován u 50 % vyšetřených vzorků [60]. Mutace a zvýšená exprese v genech *NRAS*, *KRAS* byly dokumentovány u 10 % TGCT a mohou mít také prognostický význam [81,82].

Současná léčba TGCT spočívá v chemoterapii na bázi platinových derivátů. U rezistentních nádorů bylo v rámci studií zkoušeno několik cílených terapeutik působících na enzymatické a signální dráhy zapojené do progresu TGCT. Jedním z nich byl imatinib u nádorů s overexprimovaným KIT receptorem, kdy u jednotlivých pacientů došlo k remisi onemocnění, naproti tomu ve studiích zabývajících se skupinou pacientů s detekovatelnou expresí KIT receptoru ne-

došlo po použití imatinibu k prokazatelnému zlepšení stavu pacientů [83,84]. Další z drah, na kterou byla použita cílená léčba, je hyperaktivace dráhy mTOR u TGCT, ale ani u této studie nebylo dosaženo pozitivního výsledku [85,86]. Při použití sunitinibu, multikinázového inhibitoru, bylo dosaženo remise u myši, avšak výsledky u pacientů nebyly významné [87,88].

Závěr

Za téměř samozřejmé události podílející se na vzniku TGCT se považuje aktivace KIT/SCF dráhy, vznik amplifikovaného chromozomového úseku 12p a aneuploidie těchto nádorů. Na druhou stranu zde nejsou známy žádné somatické mutace vedoucí k iniciaci tumorigeneze, chemorezistence a progresu TGCT. TGCT nesou nejméně mutací ze všech známých nádorů dospělého věku. K zjištění dalších genetických predispozic se v posledních letech využívají metody sekvenování nové generace na exomové, transkriptomové i amplikonové úrovni, avšak kombinace několika genomových lokusů a předpokládaná souhra více faktorů zevního prostředí dosud brání charakterizaci specifických genetických aberací, které by mohly být použity k predikci vzniku TGCT, stratifikaci pacientů či jako struktura pro biologickou léčbu. Ačkoli jde o nádor nejlépe odpovídající na léčbu, existuje stále část pacientů, kteří vyvinou rezistenci na terapii a pro něž není jiná dostupná alternativa. Existuje i část pacientů, kteří trpí vedlejšími nežádoucími účinky po léčbě chemoterapií, jako jsou kardiovaskulární obtíže, snížená fertilita či sekundární malignita. Nalezení nové efektivní terapie pro pacienty v pokročilém stadiu onemocnění s rezistencí na platinu a také nových prognostických faktorů umožňujících lepší stratifikaci pacientů, a tudíž snížení chemoterapeutické zátěže u pacientů nepokročilých a prognosticky příznivých, patří mezi hlavní výzvy do nejbližší budoucnosti v oblasti managementu TGCT. Paradoxně, poměrně nízká incidence TGCT a jejich vysoká míra vyléčitelnosti bohužel nepřispívají k intenzivnějšímu studiu a objasnění všech principů uplatňujících se při vzniku TGCT a průběhu tohoto onemocnění.

Literatura

- Holmes L Jr, Escalante C, Garrison O et al. Testicular cancer incidence trends in the USA (1975–2004): plateau or shifting racial paradigm? *Public Health* 2008; 122(9): 862–872. doi: 10.1016/j.puhe.2007.10.010.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74–108.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
- Parkin DM, Iscovich J. Risk of cancer in migrants and their descendants in Israel: II. Carcinomas and germ-cell tumours. *Int J Cancer* 1997; 70(6): 654–660.
- Ekbom A, Richiardi L, Akre O et al. Age at immigration and duration of stay in relation to risk for testicular cancer among Finnish immigrants in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(16): 1238–1240.
- Montgomery SM, Granath F, Ehlin A et al. Germ-cell testicular cancer in offspring of Finnish immigrants to Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(1): 280–282.
- McIntyre A, Gilbert D, Goddard N et al. Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47(7): 547–557. doi: 10.1002/gcc.20562.
- Bahrami A, Ro JY, Ayala AG. An overview of testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(8): 1267–1280.
- Shanmugalingam T, Soultati A, Chowdhury S et al. Global incidence and outcome of testicular cancer. *Clin Epidemiol* 2013; 5: 417–427. doi: 10.2147/CLEPS34430.
- Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol* 2005; 18 (Suppl 2): 51–60.
- Díez-Torre A, Silván U, Díaz-Núñez M et al. The role of microenvironment in testicular germ cell tumors. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(6): 529–536. doi: 10.4161/cbt.10.6.13227.
- Diamantopoulos N, Kortsaris A. Testicular germ cell tumors. *J BUON* 2010; 15(3): 421–434.
- Heimdal K, Olsson H, Tretli S et al. A segregation analysis of testicular cancer based on Norwegian and Swedish families. *Br J Cancer* 1997; 75(7): 1084–1087.
- Rapley EA, Crockford GP, Teare D et al. Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. *Nat Genet* 2000; 24(2): 197–200.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 16(5): 972–978.
- Ewa Rajpert-De Meyts. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 2006; 12(3): 303–323.
- Holl K, Lundin E, Surcel HM et al. Endogenous steroid hormone levels in early pregnancy and risk of testicular cancer in the offspring: a nested case-referent study. *Int J Cancer* 2009; 124(12): 2923–2928. doi: 10.1002/ijc.24312.
- Kristiansen W, Aschim EL, Andersen JM et al. Variations in testosterone pathway genes and susceptibility to testicular cancer in Norwegian men. *Int J Androl* 2012; 35(6): 819–827.
- Grassetti D, Giannandrea F, Paoli D et al. Androgen receptor polymorphisms and testicular cancer risk. *Andrology* 2015; 3(1): 27–33. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00252.x.
- Klatte T, de Martino M, Arensmeier K et al. Management and outcome of bilateral testicular germ cell tumors: a 25-year single center experience. *Int J Urol* 2008; 15(9): 821–826. doi: 10.1111/j.1442-2042.2008.02107.x.
- Pamenter B, De Bono JS, Brown IL et al. Bilateral testicular cancer: a preventable problem? Experience from a large cancer centre. *BJU Int* 2003; 92(1): 43–46.
- Ondruš D, Ondrušová M, Štastná V. Bilateral germ-cell testicular cancer – long-term experience. *Klin Onkol* 2013; 26(6): 421–424. doi: 10.14735/amko2013421.

23. Hvarness T, Nielsen JE, Almstrup K. Phenotypic characterisation of immune cell infiltrates in testicular germ cell neoplasia. *J Reprod Immunol* 2013; 100(2): 135–145. doi: 10.1016/j.jri.2013.10.005.
24. Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol Biol* 2011; 677: 459–470. doi: 10.1007/978-1-60761-869-0_29.
25. Schmelz HU, Port M, Hauck EW et al. Apoptosis: a key effector mechanism of lymphocyte action in human non-seminomatous testicular carcinoma? *BJU Int* 2005; 96(1): 158–163. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05587.x.
26. Parker C, Milosevic M, Panzarella T et al. The prognostic significance of the tumour infiltrating lymphocyte count in stage I testicular seminoma managed by surveillance. *Eur J Cancer* 2002; 38(15): 2014–2019.
27. Grobholz R, Verbeke CS, Schlegler C et al. Expression of MAGE antigens and analysis of the inflammatory T-cell infiltrate in human seminoma. *Urol Res* 2000; 28(6): 398–403.
28. Bode PK, Thielken A, Brandt S et al. Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod Pathol* 2014; 27(6): 899–905. doi: 10.1038/modpathol.2013.183.
29. Cierna Z, Mego M, Miskovska V et al. Prognostic value of programmed-death-1 receptor (PD-1) and its ligand 1 (PD-L1) in testicular germ cell tumors. *Ann Oncol* 2016; 27(2): 300–305. doi: 10.1093/annonc/mdv574.
30. Silván U, Arlucea J, Andrade R et al. Angiogenesis and vascular network of teratocarcinoma from embryonic stem cell transplant into seminiferous tubules. *Br J Cancer* 2009; 101(1): 64–70. doi: 10.1038/sj.bjc.6605125.
31. Boublíková L, Buchler T, Stary J et al. Molecular biology of testicular germ cell tumors: unique features awaiting clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89(3): 366–385. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.10.001.
32. Brabrand S, Johannessen B, Axcrona U et al. Exome sequencing of bilateral testicular germ cell tumors suggests independent development lineages. *Neoplasia* 2015; 17(2): 167–174. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.005.
33. Looijenga LH, de Leeuw H, van Oorschot M et al. Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7674–7678.
34. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A et al. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 1987; 10(1): 19–28.
35. Looijenga LH, Gillis AJ, Stoop H et al. Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. *Int J Androl* 2011; 34(4 Pt 2): 234–251. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01157.x.
36. Skotheim RI, Lothe RA. The testicular germ cell tumour genome. *APMIS* 2003; 111(1): 136–150. doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.11101181.x.
37. Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ et al. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* 1997; 8(3): 293–299.
38. Korkola JE, Houldsworth J, Bosl GJ et al. Molecular events in germ cell tumours: linking chromosome-12 gain, acquisition of pluripotency and response to cisplatin. *BJU Int* 2009; 104(9 Pt B): 1334–1338. doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.08855.x.
39. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(10): 1037–1051.
40. Runyan C, Schaible K, Molyneaux K et al. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 2006; 133(24): 4861–4869. doi: 10.1242/dev.02688.
41. Rapley EA, Hockley S, Warren W et al. Somatic mutations of KIT in familial testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2004; 90(12): 2397–2401. doi: 10.1038/sj.bjc.6601880.
42. Coffey J, Linger R, Pugh J et al. Somatic KIT mutations occur predominantly in seminoma germ cell tumors and are not predictive of bilateral disease: report of 220 tumors and review of literature. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47(1): 34–42. doi: 10.1002/gcc.20503.
43. Biermann K, Göke F, Nettersheim D et al. c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. *J Pathol* 2007; 213(3): 311–318. doi: 10.1002/path.2225.
44. Pedersini R, Vattemi E, Mazzoleni G et al. Complete response after treatment with imatinib in pretreated disseminated testicular seminoma with overexpression of c-KIT. *Lancet Oncol* 2007; 8(11): 1039–1040. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70344-3.
45. Zeron-Medina J, Wang X, Repapi E et al. A polymorphic p53 response element in KIT ligand influences cancer risk and has undergone natural selection. *Cell* 2013; 155(2): 410–422. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.017.
46. Gilbert D, Rapley E, Shipley J. Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(4): 278–288. doi: 10.1038/nrc3021.
47. Turnbull C, Rahman N. Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour. *Int J Androl* 2011; 34(4 Pt 2): e86–e96. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01162.x.
48. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Current views on the pathogenesis of testicular germ cell tumours and perspectives for future research: highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ and Cancer of the Testis. *APMIS* 2003; 111(1): 280–289.
49. Taylor-Weiner A, Zack T, O'Donnell E et al. Genomic evolution and chemoresistance in germ-cell tumours. *Nature* 2016; 540(7631): 114–118. doi: 10.1038/nature20596.
50. Mueller T, Mueller LP, Luettendorf J et al. Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance. *Tumour Biol* 2006; 27(2): 71–83. doi: 10.1159/000092324.
51. Lutzker SG. P53 tumour suppressor gene and germ cell neoplasia. *APMIS* 1998; 106(1): 85–89.
52. Houldsworth J, Xiao H, Murty VV et al. Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene* 1998; 16(18): 2345–2349. doi: 10.1038/sj.onc.1201770.
53. Bárteková J, Bártek J, Lukás J et al. p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ-cell neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 49(2): 196–202. doi: 10.1002/ijc.2910490209.
54. Riou G, Barrois M, Prost S et al. The p53 and mdm-2 genes in human testicular germ-cell tumors. *Mol Carcinog* 1995; 12(3): 124–131.
55. Peng HQ, Hogg D, Malkin D et al. Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 1993; 53(15): 3574–3578.
56. Rossi M, Colechia D, Ildardi G et al. MAPK15 upregulation promotes cell proliferation and prevents DNA damage in male germ cell tumors. *Oncotarget* 2016; 7(15): 20981–20998. doi: 10.18632/oncotarget.8044.
57. Masters JR, Köberle B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(7): 517–525. doi: 10.1038/nrc1120.
58. Tsuchiya N, Mishina M, Narita S et al. Association of XRCC1 gene polymorphisms with the susceptibility and chromosomal aberration of testicular germ cell tumors. *Int J Oncol* 2006; 28(5): 1217–1223.
59. Peng HQ, Hogg D, Malkin D et al. Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 1993; 53(15): 3574–3578.
60. Boublíková L, Bakardjieva-Mihaylova V, Skvarova Kramarova K et al. Wilms tumor gene 1 (WT1), TP53, RAS/BRAF and KIT aberrations in testicular germ cell tumors. *Cancer Lett* 2011; 376(2): 367–376. doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.016.
61. Jørgensen A, Blomberg Jensen M et al. Influence of vitamin D on cisplatin sensitivity in testicular germ cell cancer-derived cell lines and in a NTERa2 xenograft model. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 136: 238–246. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.10.008.
62. Gutekunst M, Mueller T, Weibacher A et al. Cisplatin hypersensitivity of testicular germ cell tumors is determined by high constitutive Noxa levels mediated by Oct-4. *Cancer Res* 2013; 73(5): 1460–1469. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2876.
63. Mayer F, Stoop H, Scheffer GL et al. Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9(2): 767–773.
64. Datta MW, Macri E, Signoretti S et al. Transition from in situ to invasive testicular germ cell neoplasia is associated with the loss of p21 and gain of mdm-2 expression. *Mod Pathol* 2001; 14(5): 437–442. doi: 10.1038/modpathol.3880331.
65. Koster R, Timmer-Bosscha H, Bischoff R et al. Disruption of the MDM2-p53 interaction strongly potentiates p53-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human testicular carcinoma cells via the Fas/FasL pathway. *Cell Death Dis* 2011; 2: e148. doi: 10.1038/cddis.2011.33.
66. Wermann H, Stoop H, Gillis AJ et al. Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol* 2010; 221(4): 433–442. doi: 10.1002/path.2725.
67. Honecker F, Wermann H, Mayer F et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2009; 27(13): 2129–2136. doi: 10.1200/JCO.2008.18.8623.
68. Feldman DR, Iyer G, Van Alstine L et al. Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 2014; 20(14): 3712–3720. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2868.
69. Feldman DR, Bosl GJ, Sheinfeld J et al. Medical treatment of advanced testicular cancer. *JAMA* 2008; 299(6): 672–684. doi: 10.1001/jama.299.6.672.
70. Bianco C, Strizzi L, Ebert A et al. Role of human cripto-1 in tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(2): 132–141. doi: 10.1093/jnci/dji011.
71. Spiller CM, Bowles J, Koopman P. Nodal/Cripto signaling in fetal male germ cell development: implications for testicular germ cell tumors. *Int J Dev Biol* 2013; 57(2–4): 211–219. doi: 10.1387/ijdb.130028pk.
72. Watanabe K, Hamada S, Bianco C et al. Requirement of glycosylphosphatidylinositol anchor of Cripto-1 for trans activity as a Nodal co-receptor. *J Biol Chem* 2007; 282(49): 35772–35786. doi: 10.1074/jbc.M707351200.
73. Bianco C, Strizzi L, Mancino M et al. Identification of cripto-1 as a novel serologic marker for breast and colon cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(17): 5158–5164. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0274.
74. Pilgaard L, Mortensen JH, Henriksen M et al. Cripto-1 expression in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 2014; 24(4): 360–370. doi: 10.1111/bpa.12131.
75. Hoff AM, Alagaratnam S, Zhao S et al. Identification of Novel Fusion Genes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cancer Res* 2016; 76(1): 108–116. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1790.
76. Sturgeon CL, Duffy MJ, Stenman UH et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem* 2008; 54(12): e11–e79. doi: 10.1373/clinchem.2008.105601.
77. Salem M, Gilligan T. Serum tumor markers and their utilization in the management of germ-cell tumors in adult males. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011; 11(1): 1–4. doi: 10.1586/era.10.219.
78. van Agthoven T, Looijenga LH. Accurate primary germ cell cancer diagnosis using serum based microRNA detec-

- tion (ampTsmiR test). *Oncotarget* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.10867.
- 79.** Spiller CM, Gillis AJ, Burnet G et al. Cripto: Expression, epigenetic regulation and potential diagnostic use in testicular germ cell tumors. *Mol Oncol* 2016; 10(4): 526–537. doi: 10.1016/j.molonc.2015.11.003.
- 80.** Beaver JA, Gustin JP, Yi KH et al. PIK3CA and AKT1 mutations have distinct effects on sensitivity to targeted pathway inhibitors in an isogenic luminal breast cancer model system. *Clin Cancer Res* 2013; 19(19): 5413–5422. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0884.
- 81.** Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A et al. Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *Int J Cancer* 2005; 113(2): 329–335. doi: 10.1002/ijc.20567.
- 82.** Goddard NC, McIntyre A, Summersgill B et al. KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. *Int J Androl* 2007; 30(4): 337–348. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00769.x.
- 83.** Pectasides D, Nikolaou M, Pectasides E et al. Complete response after imatinib mesylate administration in a patient with chemoresistant stage IV seminoma. *Anticancer Res* 2008; 28(4C): 2317–2320.
- 84.** Einhorn LH, Brames MJ, Heinrich MC et al. Phase II study of imatinib mesylate in chemotherapy refractory germ cell tumors expressing KIT. *Am J Clin Oncol* 2006; 29(1): 12–13. doi: 10.1097/01.coc.0000195086.47548.ef.
- 85.** Castillo-Avila W, Piulats JM, Garcia Del Muro X et al. Sunitinib inhibits tumor growth and synergizes with cisplatin in orthotopic models of cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15(10): 3384–3395. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2170.
- 86.** Mego M, Svetlovska D, Miskovska V et al. Phase II study of everolimus in refractory testicular germ cell tumors. *Urol Oncol* 2016; 34(3): 122. e17–e22. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.10.010.
- 87.** Reckova M, Mego M, Sycova-Mila Z et al. Sunitinib in patients with cisplatin-refractory germ cell tumors. *Onkologie* 2012; 35(7–8): 455–456. doi: 10.1159/000341079.
- 88.** Feldman DR, Patil S, Trinos MJ et al. Progression-free and overall survival in patients with relapsed/refractory germ cell tumors treated with single-agent chemotherapy: endpoints for clinical trial design. *Cancer* 2012; 118(4): 981–986. doi: 10.1002/cncr.26375.