



Posudek dizertační práce Mgr. Martiny Floriánové, 1. LF UK

Molekulárně genetická analýza příčin vybraných dědičných forem kolorektální polypózy.

Předložená dizertační práce se zabývá molekulárně genetickými procesy při vzniku a vývoji dědičné prekancerózy-adenomatózních polypů. Tyto vedou ke kolorektálnímu karcinomu, který představuje závažný zdravotní problém v České republice a ve vyspělých zemích světa. Autorka se podrobně věnuje především dědičným formám kolorektálního karcinomu, které vznikají na podkladě změn v APC genu a pro které je typický nález polypů – Familiární adenomatózní polypóza a MUTYH asociovaná polypóza.

Práce má 141 stran, obsahuje 66 obrázků a 24 tabulek, je v ní citováno 153 článků. Téma vychází z dlouhodobě řešených témat na Ústavu biologie a lékařské genetiky na 1. LF UK, kde je značná pozornost věnována diagnostice familiárních forem kolorektálního karcinomu. Cílem dizertační práce bylo objasnit genetické příčiny kolorektální polypózy v souboru osob bez detekované zárodečné mutace v genu APC. Byla testována přítomnost dlouhých delecí genu APC, stanovovány zárodečné mutace v genu MUTYH a genu MSH6 u probandů s monoalelickou MUTYH variací a byl testován vliv detekovaných variant APC na expresi genu.

V rozsáhlém literárním úvodu jsou shromážděny informace o studovaných drahách v patogenezi kolorektálního karcinomu a o klinických syndromech. Poslední podkapitola literárního úvodu je věnována prevenci rakoviny.

V kapitole Materiál a Metody jsou podrobně popsány vyšetřené soubory včetně kontrolních skupin a uvedeny protokoly použitých molekulárně biologických metod: MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), metoda přímého sekvenování exonu 14 genu APC, určení rozsahu dlouhé delecce genu APC s využitím mikrosatelitových markerů, metody k analýze funkčních záměn detekovaných v genu APC na úrovni RNA, mutační analýza genu MUTYH pomocí dHPLC a mutační analýza exonů 7 a 13 genu MUTYH pomocí HRM, analýza vybraných sekvenčních variant genu MUTYH u kontrolního souboru a mutační analýza genu MSH6 metodou přímého sekvenování.

Výsledky jsou nejrozsáhlejší kapitolou dizertační práce, s podrobnou dokumentací, popisem a komentáři.

Diskuze podrobně rozebírá jednotlivé nálezy ve světle literárních údajů, závěry jsou jednoznačné, a umožňují zpřesnění diagnostiky u suspektních případů klasické nebo atenuované adenomatózní polypózy, navíc dokládají metodu MLPA jako vhodnou metodiku k skríningu dlouhých delecí. Bylo potvrzeno, že detekované zárodeční varianty genu APC se nachází v místě sestřihu nebo jeho blízkém okolí a funkční analýza potvrdila predikovaný vliv na sestřih. Paralelní použití dvou metod pro mutační analýzu genu MUTYH odhalilo jako vhodnější metodu HRM oproti dHPLC (kvalitativně srovnatelné, ale HRM je rychlejší). Ve vyšetřovaném souboru byla nalezena frekvence bialelických mutací genu MUTYH 2-4% (dle



použité metodiky), což je o pětinu až desetinu nižší frekvence než celosvětová. I tak vyšetření genu MUTYH zvýšilo objasněnost příčin polypózy o zhruba 2%. Mutační analýza MSH6 u lidí s monoalelickou MUTYH mutací neodhalila žádnou zárodečnou mutaci.

Diplomová práce je velmi dobře sesazená, napsaná čtivým jazykem a přináší řadu originálních výsledků, které mají bezprostřední dopad do diagnostické praxe a doplňují a zpřesňují roli APC a MUTYH v karcinogeneze. Diplomová práce je podložena dvěma přijatými pracemi v impaktivních časopisech, obě z roku 2007 (European Journal of Cancer, kde je Mgr. Floriánová prvním autorem a dále prací v BMC Medical Genetics). Třetí práce je v recenzním řízení v časopise Familiar Cancer. Mgr. Floriánová je spoluautorkou dvou publikací bez IF (ČLČ a Klin. Onkologie) a spoluautorkou na další publikaci s IF, která nemá bezprostřední souvislost s předloženou dizertační prací.

Přes nepochybně pozitivní vědecký a praktický přínos předložené dizertační práce, mám k ní několik výhrad. Práce nese známky spěchu, některé formulace jsou nepřesné nebo postrádají smysl, citace nejsou jednotné v celém rozsahu práce (většinou jsou vedeny pod čísly, ale v kapitole 4.3.2. jsou jména autorů i čísla), mnohdy citace chybí (str. 19, první odst., poslední věta, str. 19 předposlední odst., poslední věta). Seznam zkratk není úplný. Níže pak uvádím nejvýraznější příklady nepřesností, které bylo lze dalším pročtením práce odstranit:

Podrobně:

Str. 13, Abstract: ...there was looked for germline mutation....

.....it was detected 12 sequence variants.....there were detected

Str. 14, druhý odst. – chybí citace

Str. 15, Nejčastějšími predispozicemi pro vznik hereditárních forem CRC jsou hereditární nepolypózní kolorektální karcinom a crc polypózy...tato věta nemá smysl

Str. 17 – vysvětleno MSI high and low, na str. 19 použitý termín MSI stable

Str. 18, CpG ostrůvky nejsou metylovány na rozdíl od většiny CpG bohatých oblastí, které jsou u savců metylovány

Str. 19, 18-25nt, nt není ve zkratkách

Str. 20, miR-135a a miR135b jsou také popisovány se zvýšenou expresí u kolorektálních adenomů....expresí čeho?

Str. 23 - Hereditární formy CRC jsou charakterizovány přítomností dědičného nepolypózního nebo polypózního syndromu. Jsou přítomné u 5-10% pacientů s tímto onemocněním.....a co je zbytek?

Str. 24 – zmatek ve zkratkách JPS a PJS

Str. 26 – poslední odstavec není úplně srozumitelný, navíc se pojednává o MSI ale není řečeno, že se jedná o MSI-H

Str. 28 – třetí odstavec, druhá věta není úplně srozumitelná, taky sloveso „preventující“ není správné

Str. 31 – není vysvětleno, co je a kde se vzal 8-oxodGTP

Str. 32 – v obr. Je užitá zkratka MYH, která není nikde vysvětlena, v textu chybí zmínka o variantě MUTYH^{Δ5}, která je uvedena v tabulce 3

Str. 33 – National Center for Biotechnology Information...kde?



**Ústav
experimentální
medicíny AV ČR, v.v.i.**

EU Centre of Excellence

Str. 37 – National Cancer Institute – kde?

- Obecně lze definovat, že rakovina je způsobena mnohočetnými genetickými defekty, které mohou být následkem vlivů prostředí, stravovacích návyků, životního stylu stejně jako infekčních onemocnění....nebo se tyto faktory podílí na spuštění karcinogeneze
- Karcinogenní mechanismus tabáku ...má být tabakizmu

Str. 39 – premalignantních ...premaligních

Str. 112 – citace 121 místo správné 122,

Str. 119 – poslední věta není srozumitelná

Struktura práce je velmi logická a přehledná, jenom zařazení kapitoly „Prevence rakoviny“ je mimo kontext celé práce – obzvlášť, když se v práci pojednává o **dědičných** formách rakoviny.

V dizertační práci nejsou uvedeny a přiloženy práce Mgr. Floriánové, na kterých staví svoji dizertaci. Seznam těchto prací je jenom v Autoreferátu.


K dizertační práci mám tyto dotazy:

Jaký je Váš názor na new generation sequencing? Je to metodika, která by mohla vyřešit problémy spojené s přesnou diagnostikou dědičných forem?

Jakou roli hrají faktory životního stylu a životního prostředí ve vzniku dědičných forem rakoviny?

Přes kritické výhrady **předložená dizertační práce splňuje předepsaná kritéria a doporučuji její obhájení.**

V Praze 16. 8. 2012



MUDr. Ludmila Vodičková, CSc
Ústav experimentální medicíny v.v.i AV ČR
Videňská 1083
Praha 4