

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra Biochemie



**Mgr. Eliška Václavíková**

**Genetické příčiny medulárního karcinomu štítné žlázy  
a Hirschsprungovy choroby**

**Genetic causes of medullary thyroid carcinoma  
and Hirschsprung's disease**

Disertační práce

Disertační práce byla vypracována na Oddělení molekulární endokrinologie  
Endokrinologického ústavu v Praze

**Školitel: Doc. RNDr. Běla Bendlová, CSc.**

Praha, 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze, 29. 5. 2015

## **Poděkování**

Úvodem bych ráda poděkovala zejména své školitelce doc. RNDr. Běle Bendlové, CSc. za její neustálou podporu a elán, za trpělivost a cenné rady při sepisování disertační práce a publikací. Taktéž děkuji mým nepostradatelným rádkyním a spolupracovnicím RNDr. Šárce Dvořákové a PhD. Mgr. Vlastě Sýkorové, PhD. za vzájemnou podporu a pomoc na společném tématu – studiu genetických příčin nádorů štítné žlázy. V neposlední řadě patří můj dík Mgr. Josefu Včelákovi za uvedení do tajů haplotypové analýzy, jakožto i všemožných metodických poznatků. Děkuji také všem dalším milým kolegům z Oddělení molekulární endokrinologie za vytvoření skvělého, přátelského pracovního prostředí, všestrannou podporu a ochotu pomoci.

Disertační práce by nevznikla bez spolupráce s klinickými pracovišti, především s Fakultní nemocnicí v Motole. Děkuji zvláště prof. MUDr. Petru Vlčkovi, CSc. z Kliniky nukleární medicíny a endokrinologie 2. LF UK a FNM, který zajišťoval klinickou stránku výzkumu pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy, a prof. MUDr. Richardu Škábovi, CSc. a MUDr. Lucii Poš z Kliniky dětské chirurgie 2. LF UK a FNM za vstřícnost a milou spolupráci při zajištění vzorků pacientů s Hirschsprungovou chorobou. Děkuji také všem pacientům a jejich rodinným příslušníkům účastnících se této studie.

Zvláštní poděkování patří mé sestře Adélce a v první řadě mým rodičům Vladimíru Václavíkovi a in memoriam Zdeňce Václavíkové za důležitou podporu, pochopení a čas, který mi vždy věnovali.

Každý má na této práci svůj podíl, bez kterého by nemohla vzniknout, a za to jim náleží můj velký dík.

Tato práce byla podporována grantovými projekty GAUK 411611, GAČR 301/06/P425, IGA MZ ČR NR/7806-3, IGA MZ ČR NR/9165-3, IGA MZ ČR NT13901-4 a RVO MZ ČR 00023761.

## Obsah

Abstrakt (česky) .....	6
Abstract (anglicky) .....	7
<b>1. Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Neurokristopatie</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 RET proto-onkogen a RET tyrozinkinázový receptor</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 Medulární karcinom štítné žlázy</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Štítná žláza .....	12
1.3.2 Karcinomy štítné žlázy .....	13
1.3.3 Klinické rysy MTC .....	15
1.3.4 Klasifikace MTC .....	15
1.3.5 Diagnostika a léčba MTC .....	16
1.3.6 Genetické příčiny MTC .....	19
1.3.7 Molekulárně genetický screening a management u pacientů s MTC .....	25
<b>1.4 Hirschsprungova choroba</b> .....	<b>28</b>
1.4.1 Epidemiologie HSCR .....	29
1.4.2 Historie HSCR .....	29
1.4.3 Symptomy HSCR .....	30
1.4.4 Diagnostika a léčba HSCR .....	31
1.4.5 Genetické příčiny HSCR .....	31
<b>2. Cíle a hypotézy</b> .....	<b>36</b>
<b>3. Metody</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Studované soubory</b> .....	<b>37</b>
3.1.1 Soubor pacientů s MTC .....	37
3.1.2 Soubor pacientů s HSCR .....	37
3.1.3 Kontrolní soubor .....	38
3.1.4 Klinicko-patologická data .....	38
<b>3.2 Molekulárně genetická analýza</b> .....	<b>39</b>
3.2.1 Izolace DNA .....	39
3.2.2 Sekvenační analýza (Sangerova) .....	39
3.2.3 Sekvenování nové generace .....	43
3.2.4 Genotypizace polymorfismů pomocí TaqMan sond .....	44
<b>3.3 In silico analýza</b> .....	<b>45</b>
<b>3.4 Statistická analýza</b> .....	<b>46</b>
<b>4. Výsledky, komentáře a diskuze</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1 Detekce zárodečných mutací v RET proto-onkogenu u pacientů s MTC</b> .....	<b>47</b>
4.1.1 Výsledky .....	47
4.1.2 Diskuze a komentář k přílohám č. 7–11 .....	50
4.1.2.1 Záchyt zárodečných mutací v českých rodinách s MTC .....	50
4.1.2.2 Korelace genotypu RET proto-onkogenu s fenotypovými projevy ....	52
4.1.2.3 Mutace Tyr791Phe ve 13. exonu RET proto-onkogenu .....	52
4.1.3 Shrnutí .....	55

<b>4.2 Detekce somatických mutací v <i>RET</i> proto-onkogenu u pacientů s MTC .....</b>	<b>57</b>
4.2.1 Výsledky .....	57
4.2.2 Diskuze a komentář k přílohám č. 12–13 .....	58
4.2.3 Shrnutí .....	60
<b>4.3 Studium polymorfismů v <i>RET</i> proto-onkogenu u pacientů s MTC .....</b>	<b>61</b>
4.3.1 Výsledky .....	61
4.3.2 Diskuze .....	65
4.3.3 Shrnutí .....	68
<b>4.4 Detekce zárodečných mutací v <i>RET</i> proto-onkogenu u pacientů s HSCR .....</b>	<b>69</b>
4.4.1 Výsledky .....	69
4.4.2 Diskuze a komentář k přílohám č. 14–15 .....	71
4.4.3 Shrnutí .....	75
<b>4.5 Studium polymorfismů v <i>RET</i> proto-onkogenu u pacientů s HSCR .....</b>	<b>76</b>
4.5.1 Výsledky .....	76
4.5.2 Diskuze a komentář k příloze č. 16 .....	78
4.5.3 Shrnutí .....	80
<b>5. Závěr .....</b>	<b>81</b>
Literatura .....	84
Seznam zkratk .....	98
Seznam obrázků .....	99
Seznam tabulek .....	100
Publikační a prezentační aktivita .....	101
Publikační činnost .....	101
Prezentační činnost .....	103
Seznam příloh .....	109
Přílohy .....	110

## Abstrakt

Medulární karcinom štítné žlázy (MTC) a Hirschsprungovu chorobu (HSCR) spojuje jejich společné zařazení mezi neurokristopatie, čili onemocnění spjatá s tkáněmi a buňkami, jejichž původ je v neurální liště. Právě v buňkách pocházejících z neurální lišty, kam patří i parafolikulární buňky štítné žlázy, jejichž zmnožením vzniká MTC, a enterické gangliové buňky, jejichž absencí v gastrointestinálním traktu se manifestuje Hirschsprungova choroba, se exprimuje membránový tyrozinkinázový receptor RET. Tento receptor má významnou úlohu při proliferaci, diferenciaci a přežívání těchto buněk a jeho prostřednictvím je aktivováno mnoho signálních drah. Pokud dojde k porušení přísně regulované aktivace, např. vlivem mutací v konkrétních místech jeho genu, stává se *RET* velmi účinným onkogenem. Aktivující zárodečné mutace v *RET* proto-onkogenu vedou ke vzniku familiárních forem MTC, zatímco sporadické formy MTC jsou způsobeny somatickými mutacemi v nádorové tkáni. Naopak inhibující mutace vyvolají poruchu migrace prekursorů gangliových buněk při vývoji enterického nervového systému a vznik HSCR. V ojedinělých případech se obě onemocnění u pacienta sdružují vlivem mutací schopných aktivace i inaktivace. I v případech, kdy kauzální mutace není v celém genu zastížena, vazebné studie poukazují na majoritní účast *RET* proto-onkogenu v patogenezi obou onemocnění. Pozornost se proto soustředí také na význam polymorfismů jako modifikujících faktorů, schopných ovlivnit expresi proteinu a podílet se na vzniku a modulaci onemocnění. Disertační práce zde předkládá rozsáhlou studii zaměřenou na zkoumání různých rolí *RET* proto-onkogenu v souvislosti s MTC a HSCR. Kromě detekce hlavních genetických příčin MTC a HSCR bylo u pacientů s HSCR vymezeno riziko vzniku MTC. U pacientů byly studovány polymorfismy vybrané z různých částí genu a bylo zjištěno zvýšení či snížení rizika ve spojení s konkrétními variantami. Genetické změny, mutace i polymorfismy, byly korelovány s fenotypovými projevy, přičemž byla využita obsáhlá klinicko-patologická data pacientů poskytující informace o formě, agresivitě a vývoji onemocnění, z nichž bylo možné usuzovat na prognózu nemoci a riziko pro rodinné příslušníky. Vzhledem k možnostem molekulárně genetického vyšetření se v rodinách s familiární formou MTC zásadně změnila prevence a léčba MTC, kdy lze onemocnění predikovat již v preklinickém stadiu a předejít mu profylaktickým výkonem.

## Abstract

Medullary thyroid carcinoma (MTC) and Hirschsprung's disease (HSCR) are classified as simple neurocristopathies, i.e. diseases linked to neural crest-derived cells. MTC is derived from parafollicular cells of the thyroid and HSCR is characterized by absence of enteric ganglia in the gastrointestinal tract. The *RET* proto-oncogene is only expressed in neural crest-derived cells, including parafollicular cells and enteric neurons. The *RET* encodes a transmembrane tyrosinekinase receptor that plays an important role during proliferation, differentiation and cell survival, and activates many signaling pathways. If the strictly regulated activation fails, e.g. due to mutations in the specific gene locations, the *RET* becomes a highly effective oncogene. Activating germline mutations in the *RET* proto-oncogene lead to hereditary forms of MTC, whereas sporadic forms of MTC are caused by somatic mutations in the tumor tissue. On the contrary, inactivating mutations induce migration failure of ganglion cell precursors during the development of enteric nervous system and result in the development of HSCR. In rare cases, the coexistence of both diseases is caused by mutations with a dual gain-of-function and loss-of-function character. Linkage studies confirm the influence of the *RET* proto-oncogene in the pathogenesis of diseases even in patients without a detected causing mutation. Therefore, the attention has also been turned on polymorphisms such as modifying factors which may affect protein expression and contribute to the disease formation and modulation. The thesis is focused on different roles of the *RET* proto-oncogene in the pathogenesis of MTC and HSCR. In addition to detection of the major genetic causes in MTC and HSCR patients, the risk of MTC in HSCR patients was defined. Polymorphisms in selected regions were studied and the risk in association with specific variants was evaluated. Genetic alterations - mutations and polymorphisms, were correlated with phenotype manifestation using extensive clinical and pathological data of patients providing information on the form, aggressiveness and development of the disease. Genotype-phenotype correlations enabled to deduce the disease prognosis and the risk for family members. Thanks to molecular genetic testing in families with MTC and HSCR, the prevention and treatment of hereditary MTC have been improved and resulted in the disease prediction in preclinical stage and prevention by early intervention with prophylactic thyroidectomy.

## 1. Úvod

### 1.1 Neurokristopatie

V r. 1974 americký patolog Robert P. Bolande zavedl pro onemocnění odvozená od neurální lišty termín neurokristopatie (Bolande 1997). Buňky neurální lišty se při embryonálním vývoji rozptylují po celém organismu, diferencují do mnoha tkání a vzniká tak mnoho buněčných populací. Mezi ně řadíme např. parafolikulární buňky štítné žlázy, enterické gangliové buňky a chromafinní buňky dřeně nadledvin. Neurokristopatie jsou klasifikovány na jednoduché, pro něž je charakteristický pouze jeden patologický proces, a komplexní, sdružující více jednoduchých neurokristopatií (Tab. 1). Medulární karcinom štítné žlázy (MTC), Hirschsprungova choroba (HSCR) či feochromocytom patří k jednoduchým neurokristopatiím. Syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie (MEN) typu 2, který sdružuje medulární karcinom štítné žlázy zejména s feochromocytomem, řadíme mezi komplexní neurokristopatie.

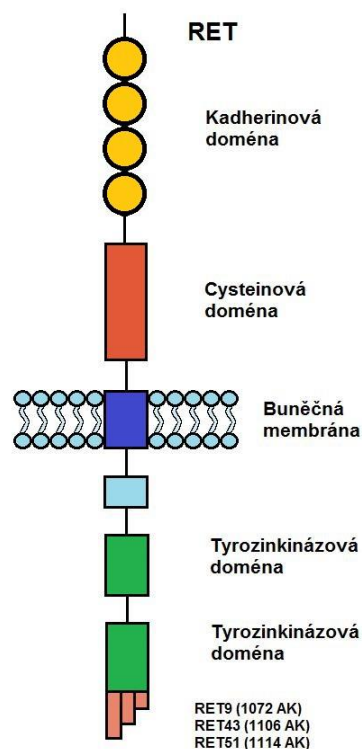
**Tab. 1** Klasifikace neurokristopatií (podle Bolande 1997)

<b>Jednoduché neurokristopatie</b>
<b>Dysgenetické:</b>
Hirschsprungova choroba
Albinismus
Mandibulofaciální dysostóza
Otocefalie
<b>Neoplastické:</b>
Medulární karcinom štítné žlázy
Fechromocytom
Neuroblastom
Melanotický progonom
Nonchromafinní paragangliom
Karcinoidní nádory
<b>Komplexní neurokristopatie</b>
Mnohočetná endokrinní neoplázie typu 1
Mnohočetná endokrinní neoplázie typu 2A
Mnohočetná endokrinní neoplázie typu 2B
Neurofibromatóza (von Recklinghausenova choroba)
Neurokutánní melanóza
Familiární neuroblastom s Hirschsprungovou chorobou



## 1.2 *RET* proto-onkogen a *RET* tyrozinkinázový receptor

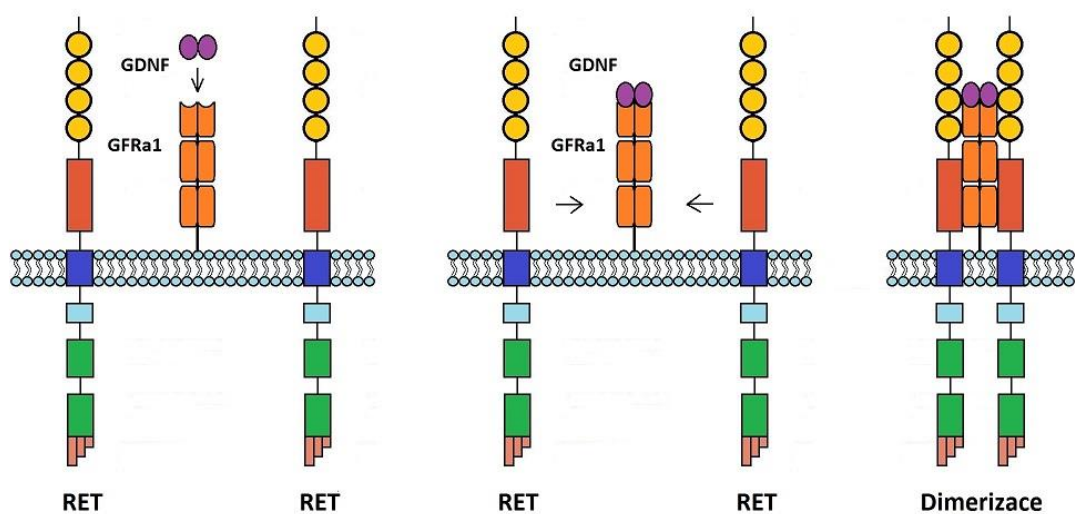
Velmi podstatnou úlohu v patogenezi některých neurokristopatií, jako jsou syndromy mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2, medulární karcinom štítné žlázy, feochromocytom a Hirschsprungova choroba, má *RET* (*RE*arranged during *Trans*fection) proto-onkogen. *RET* proto-onkogen je gen lokalizovaný na 10. chromozómu (10q11.2), je dlouhý přibližně 55 kb a má 21 exonů (Pasini et al. 1995). Je velice důležitý při vývoji jedince a při proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk. Uplatňuje se při morfogenezi ledvin, maturaci periferního nervového systému a spermatogenezi (Pachnis et al. 1993, Schuchardt et al. 1994). Tento gen kóduje membránový tyrozinkinázový receptor, který je exprimován v urogenitálních prekursorových buňkách, ale především v buňkách pocházejících z neurální lišty (Avantaggiato et al. 1994).



**Obr. 1** Schéma *RET* proteinu (podle de Groot et al. 2006)

*RET* protein má stejně jako jiné tyrozinkinázové receptory intracelulární, transmembránovou a extracelulární doménu (Takahashi et al. 1988). Extracelulární doména obsahuje čtyři kadherinu podobné domény, závislé na přísunu vápenatých iontů,

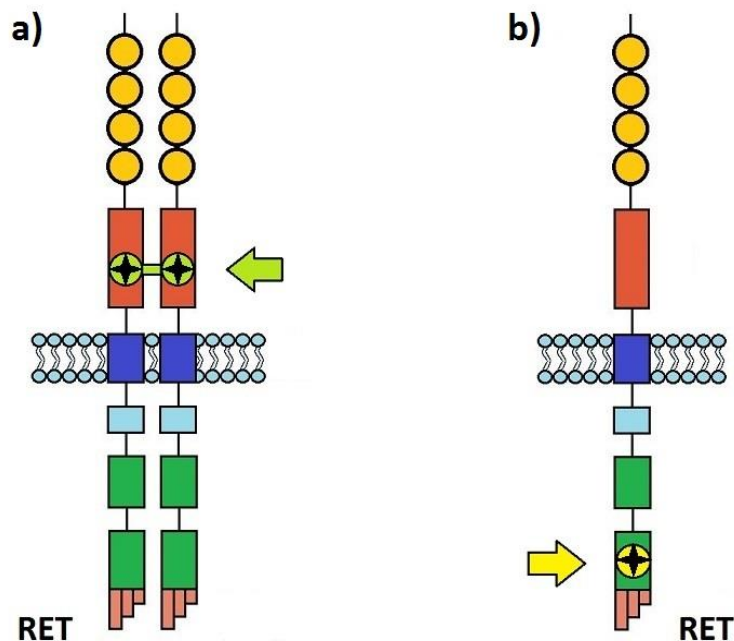
které vyvolávají a stabilizují konformační změny potřebné pro interakci s ligandy a koreceptory, dále oblast bohatou na cystein, zodpovědnou za terciární strukturu a utvoření dimerů pomocí disulfidických vazeb, a také nespočet glykosylačních míst (Obr. 1). Intracelulární doména zahrnuje dvě tyrozinkinázové domény, které jsou zapojeny do aktivace mnoha signálních drah (de Groot et al. 2006). RET má tři izoformy vznikající alternativním sestřihem na 3'konci, které obsahují 9 (RET9), 43 (RET43) či 51 (RET51) aminokyselin za glycinem v kodónu 1063 (Myers et al. 1995). Hlavními izoformami *in vivo* jsou RET9 a RET51.



**Obr. 2** Schéma aktivace RET tyrozinkinázového receptoru za normálních podmínek – vazba ligandu na koreceptor a následná dimerizace receptoru

Za normálních podmínek je RET protein aktivován komplexem ligandu a koreceptoru. Mezi jeho ligandy se řadí glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin (NTN), artemin (ART) a persefin (PSP). Koreceptory patří k rodině GDNF-family receptor  $\alpha$  ( $GFR\alpha$ ) a jsou na povrchu buňky ukotveni glykosylfosfatidylinositolovou vazbou. Každý ligand GDNF, NTN, ART a PSP má svůj specifický koreceptor  $GFR\alpha$  1-4 (v pořadí, ve kterém jsou uvedeny). Po interakci komplexu ligand-koreceptor s receptorem RET dochází k dimerizaci receptoru (Obr. 2), jeho aktivaci a autofosforylaci a k přenosu signálu do buňky. Bylo identifikováno nejméně 18 specifických fosforylačních míst (zejména tyrozinových zbytků), které jsou zapojeny do fosforylace RET proteinu a aktivace

signálních drah (Liu et al. 1996, Ichihara et al. 2004, Santoro et al. 2004). RET receptor pak prostřednictvím RAS proteinu aktivuje MAP kinázovou signální dráhu a je zapojen i do aktivace PI3K-AKT, p38MAPK, Src/JAK/STAT3, JNK a proteinkinázy C (Lodish et al. 2008). Pokud dojde k porušení této přísně regulované aktivace, např. vlivem mutací v konkrétních místech *RET* proto-onkogenu, stává se *RET* velmi účinným onkogenem.



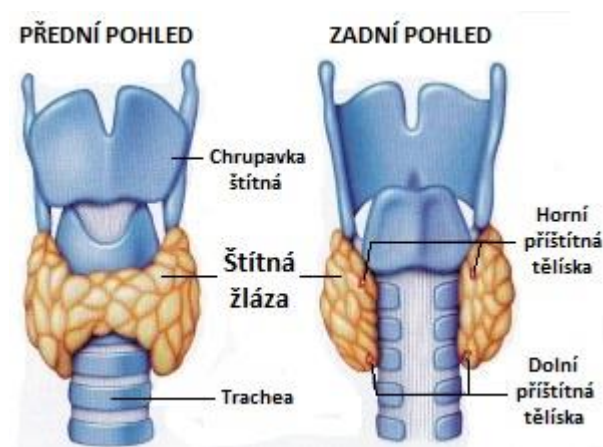
**Obr. 3** Aktivace aberantního RET tyrozinkinázového receptoru s mutací **a)** v extracelulární doméně a **b)** v intracelulární doméně

Aktivace aberantního RET tyrozinkinázového receptoru je založena na třech různých mechanismech, v závislosti na lokalizaci dané mutace (Machens et al. 2008). Mutace lokalizované v extracelulární doméně, konkrétně v doméně bohaté na cystein, způsobí dimerizaci a fosforylaci proteinu nezávisle na jeho ligandu (Obr. 3a). Mutace v intracelulární doméně umožní vlivem změny terciární struktury přístup ATP k vazebnému místu v tyrozinkinázové doméně. Podobně mutace nacházející se v intracelulárním katalytickém jádře (Obr. 3b) usnadní přístup substrátu do katalytického jádra. Aktivace se tak vlivem mutací v intracelulární doméně stává nezávislá jak na ligandu, tak na dimerizaci (Santoro et al. 1995, Pasini et al. 1997, Plaza-Menacho et al. 2005).

### 1.3 Medulární karcinom štítné žlázy

#### 1.3.1 Štítná žláza

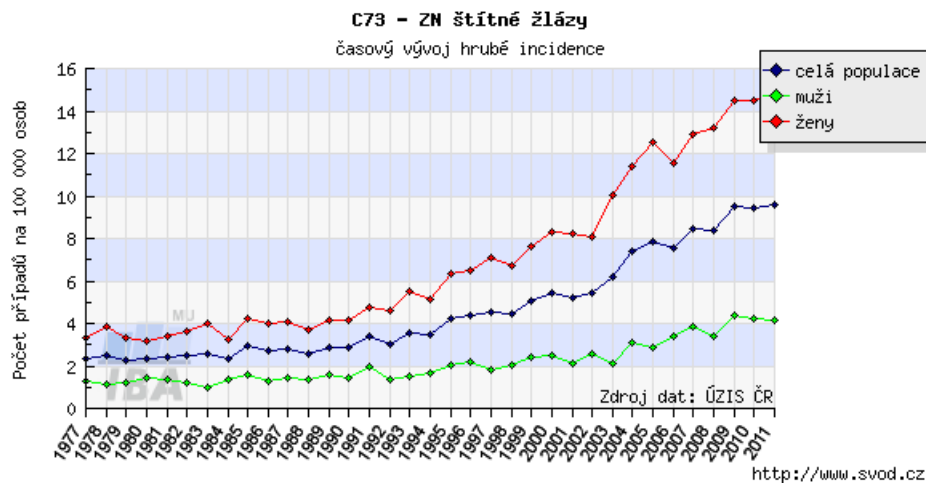
Štítná žláza (Obr. 4) je endokrinní orgán skládající se ze dvou laloků oválného až trojúhelníkového tvaru, které naléhají na hrtan a průdušnici, před kterou jsou propojeny istmem. Na zadní straně laloků jsou pak uloženy horní a dolní párové útvary zvané příštítná tělíska. Velikost štítné žlázy je závislá na věku, pohlaví a geografických podmínkách, je větší u žen než u mužů a její hmotnost se pohybuje mezi 20 až 60 g. Štítná žláza je obklopena mnoha lymfatickými uzlinami, které jsou klasifikovány do šesti krčních sektorů. Tkáň štítné žlázy je členěna na lobuly skládající se z váčků, tzv. folikulů, které jsou vzájemně odděleny vazivem a kapilárními a lymfatickými pleteněmi. Stěna folikulů je tvořena jednou vrstvou folikulárních buněk, které nasedají na bazální membránu. Folikuly jsou vyplněny koloidem, jehož hlavní složkou je glykoprotein tyreoglobulin. Z krevního řečiště je vychytáván jód a transportován do koloidu, kde se podílí na tvorbě hlavních hormonů štítné žlázy – tyroxinu a trijodtyroninu. Tyto hormony v cílových tkáních a buňkách regulují oxidační děje spojené se spotřebou kyslíku a termoregulací a ovlivňují růst a vývoj. Součástí folikulů nejsou parafolikulární buňky štítné žlázy, tzv. C-buňky, které produkují další hormon kalcitonin. Tento hormon snižuje hladinu vápenatých iontů v krvi, jeho cílové buňky jsou v kostech, ledvinách a tenkém střevě a je antagonistou parathormonu, který je produkován buňkami příštítných tělísek.



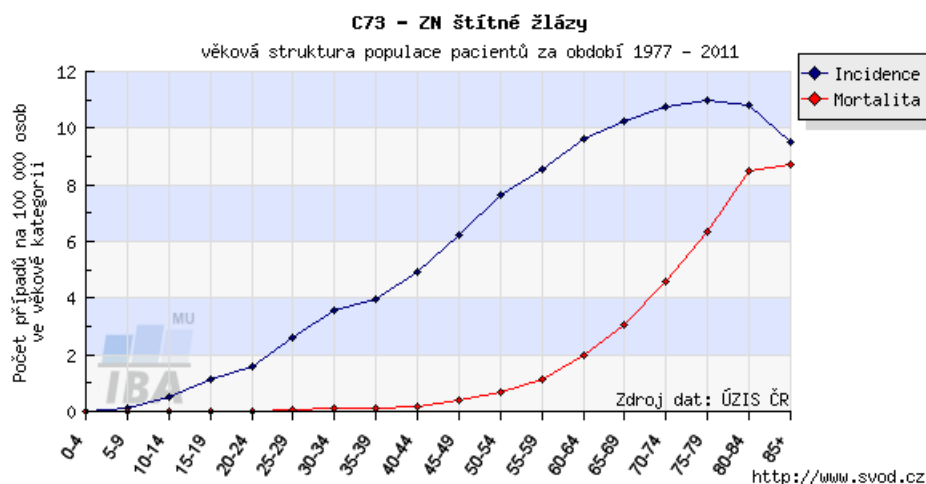
Obr. 4 Štítná žláza ([www.ofhealthandbeauty.co.uk](http://www.ofhealthandbeauty.co.uk))

### 1.3.2 Karcinomy štítné žlázy

Karcinomy štítné žlázy celkově tvoří asi 1 % všech onkologických onemocnění, avšak představují nejčastější malignitu endokrinních žláz (90 %). Jedná se o heterogenní skupinu nádorů, které se liší ve své morfologii i biologickým chováním. Vyskytují se ve všech věkových skupinách a 3-5 x častěji u žen než u mužů (Obr. 5, 6).

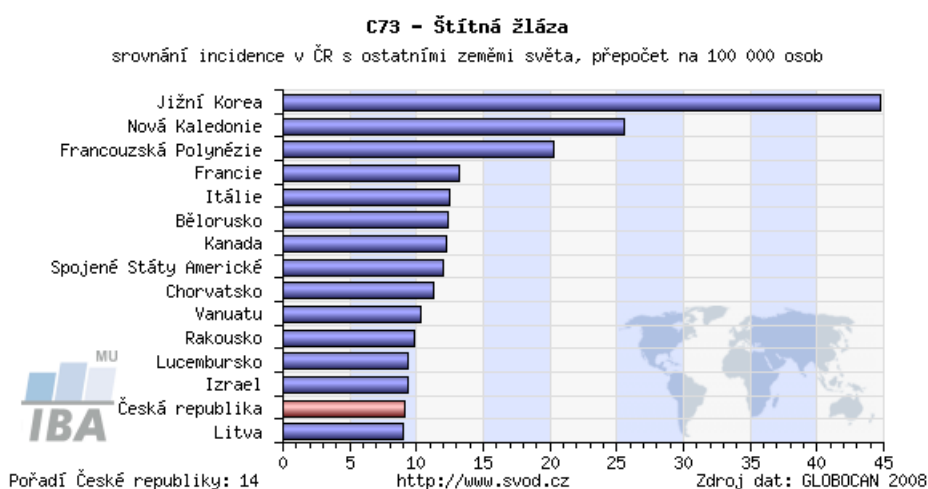


**Obr. 5** Vývoj hrubé incidence karcinomu štítné žlázy (počet nových případů na 100 000 osob) u českých pacientů mezi lety 1977-2011 ve srovnání celé populace s populací mužů a žen



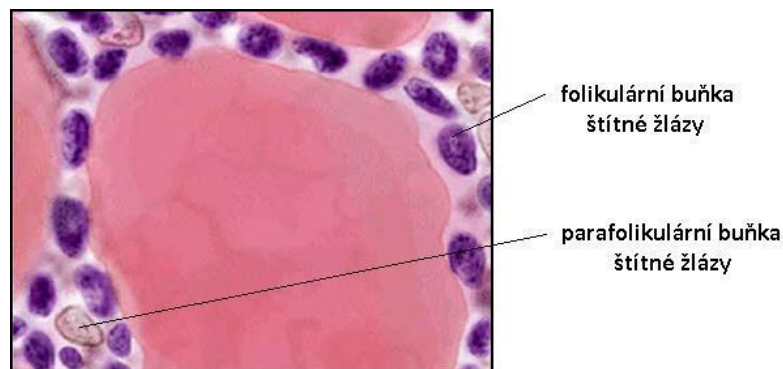
**Obr. 6** Věková struktura pacientů s karcinomem štítné žlázy v období let 1977-2011; incidence a mortalita je vztažena na 100 000 osob v dané věkové kategorii

Celosvětový vzestup jejich incidence se částečně vysvětluje zlepšením diagnostiky, což má příznivý dopad na zachycení nádoru v ranějších a lépe léčitelných stadiích onemocnění. Zároveň se však zvyšuje agresivita karcinomů štítné žlázy. Známými rizikovými faktory je ionizující záření, nedostatek či nadbytek jodu v potravě, jiná onemocnění štítné žlázy, geografické rozdíly či hormonální a dědičné vlivy. Česká republika je ve srovnání se světem na 14. místě v incidenci karcinomu štítné žlázy a 7. místě ve srovnání s Evropou (Obr. 7).



**Obr. 7** Srovnání hrubé incidence karcinomu štítné žlázy v České republice s ostatními zeměmi světa

Karcinomy štítné žlázy se člení na tři základní varianty podle jejich původu a způsobu vzniku (Obr. 8). Z folikulárního epitelu štítné žlázy vznikají diferencované karcinomy, kam se řadí nejčastěji se vyskytující papilární karcinom (44-81 %) a folikulární karcinom štítné žlázy (5-18 %). Jejich dediferenciací vznikají nádory nediferencované (3-15 %), nazývají se anaplastické karcinomy štítné žlázy a jsou velice agresivní. Do třetí skupiny patří medulární karcinom štítné žlázy (MTC), který jako jediný vychází z parafolikulárních buněk štítné žlázy. Má jiný embryonální původ než ostatní nádory, protože parafolikulární buňky vznikají z neuroektodermu (neurální lišty), na rozdíl od folikulárních buněk pocházejících z endodermu (Vlček et al. 2002).



**Obr. 8** Buňky štítné žlázy

### 1.3.3 Klinické rysy MTC

MTC představuje 8 % všech karcinomů štítné žlázy. Je tvořen vřetenovitými či polygonálními buňkami s nepravidelnou trámčinou. Za prekancerózu je považována hyperplázie C-buněk (CCH), která se liší od fyziologické CCH průkazem atypických buněk v neoplastické formě. MTC (i CCH) bývá lokalizován především v horních a středních třetinách laloků štítné žlázy. Často také postihuje lokální (krční) lymfatické uzliny a vzdáleně metastazuje do jater (25-30 % MTC), plic a kostí. Průměrná doba přežití 5 let se uvádí u 83 % pacientů, důležitým ukazatelem je TNM klasifikace nádoru, která popisuje rozsah onemocnění ve 3 složkách: T (tumor) vyjadřuje rozsah primárního nádoru, N (nodus) postižení regionálních lymfatických uzlin a M (metastasis) přítomnost vzdálených metastáz. Kombinací různých hodnot T, N a M se určuje stadium onemocnění.

### 1.3.4 Klasifikace MTC

MTC se vyskytuje především ve sporadické formě (75 %), ale ve čtvrtině případů se onemocnění dědí autosomálně dominantně. U familiární formy a přibližně 30 % sporadických případů vzniká multicentricky a bilaterálně. Familiární forma se vyskytuje ve třech variantách – jako součást syndromu mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2 (MEN 2), která má dva podtypy 2A a 2B, a jako familiární medulární karcinom štítné žlázy (FMTC). Prevalence MEN 2 je odhadována na 2,5 : 100 000 obyvatel. U pacientů

se syndromem MEN 2A (15-23 % MTC) bývá MTC asociován s feochromocytomem a primární hyperparathyreózou (Tab. 2) a onemocnění se objevuje i před 20. rokem života pacienta. Pro pacienty s agresivnějším syndromem MEN 2B (1 % MTC) jsou kromě MTC a feochromocytomu typickými symptomy marfanoidní habitus, slizniční neurinomy, ganglioneuromatóza a oční anomálie (ztluštělé nervy v rohovce). Tyto výrazné fenotypické rysy (marfanoidní habitus, neurinomy na jazyku a rtech) se projevují již v brzkém dětském věku, k manifestaci MTC dochází většinou mezi 10. – 20. rokem pacienta, ale výjimkou nejsou ani případy MTC u mnohem mladších dětí. Feochromocytom se u MEN 2 vyskytuje většinou 8-10 let po manifestaci MTC. U FMTC (1-9 % MTC) se žádné jiné asociované léze nevyskytují. Za rodinu s FMTC je dle mírnější klasifikace pokládána rodina, kde byla diagnóza MTC, popř. CCH, potvrzena u dvou členů rodiny a více. Přísnější mezinárodní pravidla požadují minimálně čtyři postižené, aby byla rodina hodnocena jako FMTC. Věk nástupu onemocnění je u FMTC velice variabilní (mezi 20 – 70 lety) (Vlček et al. 2002, Becker et al. 2005, de Groot et al. 2006, Bendlová et al. 2009, Raue et al. 2012).

**Tab. 2** Klinické projevy familiárních forem MTC (podle de Groot 2006 et al.)

	<b>FMTC</b>	<b>MEN 2A</b>	<b>MEN 2B</b>
MTC	100 %	100 %	100 %
Feochromocytom	0 %	10-60 %	50 %
Primární hyperparathyreóza	0 %	10-30 %	0 %
Marfanoidní habitus	0 %	0 %	100 %
Ganglioneuromatóza	0 %	0 %	60-90 %
Slizniční neurinomy	0 %	0 %	70-100 %
Oční anomálie	0 %	0 %	60-90 %
Hirschsprungova choroba	vzácně	vzácně	0 %

### 1.3.5 Diagnostika a léčba MTC

MTC vzhledem k odlišnému embryonálnímu původu nemá na rozdíl od diferencovaných karcinomů schopnost akumulovat radiojód a tedy i diagnostický a terapeutický přístup je jiný (Vlček et al. 2002). Při diagnostice MTC se využívá skutečnosti, že normální i nádorově transformované C-buňky produkují hormon kalcitonin. Při nádorovém procesu hladiny kalcitoninu v krvi stoupají a kalcitonin tak slouží jako nádorový marker. Stanovují se



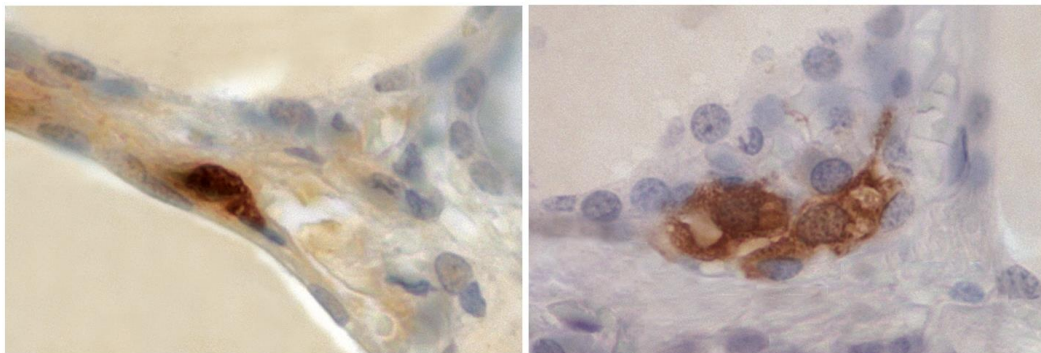
bazální hladiny a hladiny stimulovaného kalcitoninu vyvolané podáním kalcia. Dříve se ke stimulaci používal také pentagastrin, ale již není v České republice k dispozici. Laboratorně lze také zjistit zvýšené hladiny karcinoembryonálního antigenu (CEA).



Copyright © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

**Obr. 9** Aspirační biopsie tenkou jehlou

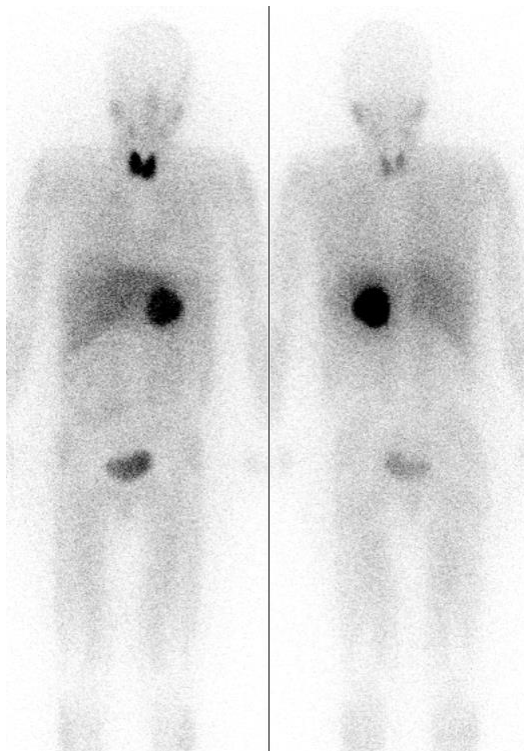
Nepostradatelnou roli zde má sonografické vyšetření. Lze jej rovněž využít ke zjištění případného poškození krčních lymfatických uzlin. Předoperačně je možné potvrdit přítomnost MTC i po odběru aspirační biopsie tenkou jehlou (FNAB) (Obr. 9) pomocí cytologického vyšetření a imunohistochemie (Obr. 10). Nejlepších výsledků lze dosáhnout, pokud je odběr materiálu proveden současně za sonografické kontroly. Při FNAB je nutné získat určitý minimální počet buněk, materiál se zpracovává jako hematologický nátěr a hodnotí jej makroskopicky i mikroskopicky cytolog zkušený v thyreoidální patologii. Při imunohistochemickém barvení jsou nádorové buňky negativní na tyreoglobulin a pozitivní na kalcitonin, CEA a chromogranin A.



Copyright © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

**Obr. 10** Normální nález C-buněk při imunohistochemickém barvení (buňky se barví po reakci s protilátkou proti kalcitoninu)

Terapie spočívá v radikálním chirurgickém výkonu, jehož základem je dokonalé odstranění celé štítné žlázy, tzv. totální thyreoidektomie (TTE). Při postižení regionálních lymfatických krčních uzlin je navíc provedena modifikovaná bloková krční disekce. Histologické vyšetření odoperované nádorové tkáně potvrzuje diagnózu MTC. Pooperačně se u pacientů dlouhodobě sleduje hladina kalcitoninu, jejíž opětovné zvýšení může znamenat recidivu onemocnění. Při recidivě onemocnění je nezbytná reoperace.



**Obr. 11** Scintigrafie  $^{123}\text{I}$ -MIBG u pacienta s feochromocytomem  
([en.wikipedia.org/wiki/lobenguane](https://en.wikipedia.org/wiki/lobenguane))

U pacientů s MTC je rovněž prováděn screening na přítomnost feochromocytomu a primární hyperparathyreózy, který je u feochromocytomu založen na měření krevního tlaku a hladin močových či plazmatických katecholaminů a jejich metabolitů (metanefrinů, adrenalinu, noradrenalinu, kyseliny vanilmandlové), a v případě hyperparathyreózy na měření hladin parathormonu, fosfátu a sérového kalcia. Významnou úlohu pro monitorování vzniku feochromocytomu a případných vzdálených metastáz mají také další zobrazovací metody. Jednou z nich je scintigrafie radiojódem  $^{123}\text{I}$  značeným metajodobenzylguanidinem (MIBG), při které se snímky provádějí za 4 a 24 hodin

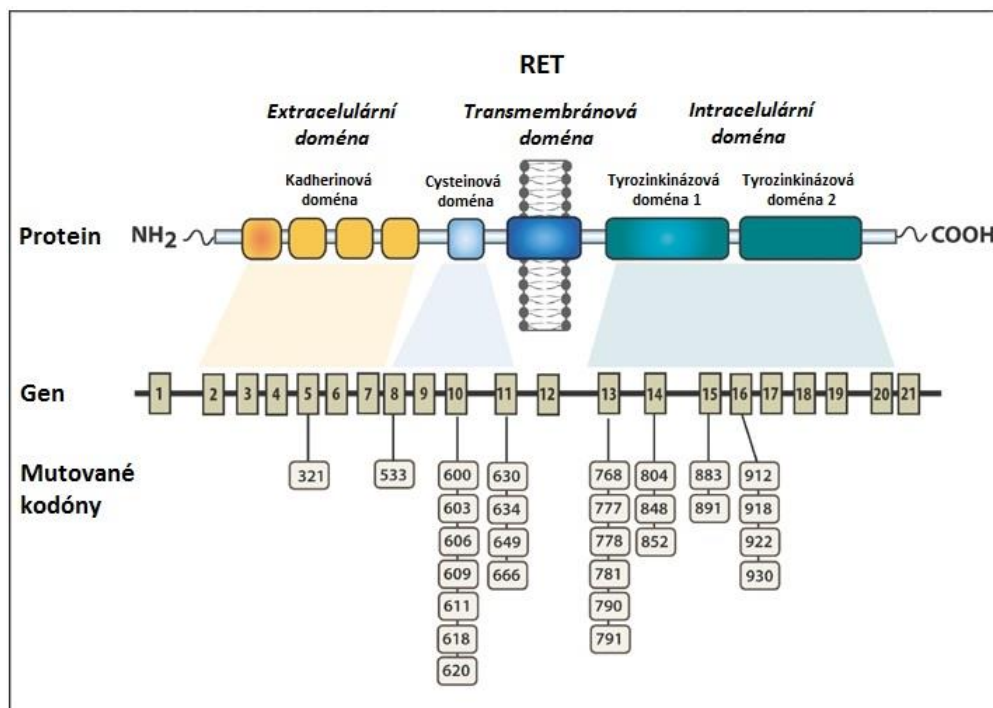
po nitrožilní aplikaci radiofarmaka (Obr. 11). Při pozitivní akumulaci radiofarmaka v nádorové tkáni je možné podat terapeutickou dávku  $^{131}\text{I}$ -MIBG, která má dobrou odezvu u 1/3 pacientů se vzdálenými metastázami, zejména jater, a opakuje se v intervalu 6 až 12 měsíců. Často má však pouze paliativní charakter. Dalšími zobrazovacími metodami, které se provádějí zvláště u pokročilých případů MTC, je počítačová tomografie (CT) hrudníku a břicha, scintigrafie skeletu, scintigrafie  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI (methoxyisobutylisonitril),  $^{111}\text{In}$ -Ostreoscan, magnetická rezonance a pozitivní emisní tomografie (PET). Zevní aktinoterapie je indikována po výkonu v případě postižení uzlin nebo po chirurgickém odstranění vzdálených metastáz. Chemoterapie nebývá při léčbě MTC běžná, ale zvažuje se u nálezu mnohočetných metastáz, které nelze chirurgicky odstranit (Vlček 2011).

Nadějně se jeví molekulárně cílená terapie založená na farmakologické inhibici tyrozinkináz. V České republice byla v roce 2014 zavedena léčba preparáty vandetanib (inhibitor tyrozinkináz RET, EGFR, VEGFR-2) a cabozantinib (inhibitor tyrozinkináz RET, MET, VEGF). Jsou zatím indikovány u pacientů s progresivním, inoperabilním lokálně pokročilým nebo metastatickým MTC. V klinických studiích bylo prokázáno statisticky signifikantní prodloužení doby přežití bez progresu onemocnění oproti placebo, a to především u pacientů s mutací v *RET* proto-onkogenu. Do budoucna se zvažuje i genová terapie a využití mikroRNA.

### 1.3.6 Genetické příčiny MTC

FMTC a syndromy MEN 2 jsou považovány za monogenní onemocnění, jelikož v současnosti je jediná známá příčina těchto onemocnění spojena se zárodečnými aktivujícími mutacemi v *RET* proto-onkogenu. *RET* proto-onkogen byl objeven a lokalizován na základě vazebných analýz u rodin s MEN 2 mezi lety 1985-1987 (Takahashi et al. 1985, Mathew et al. 1987, Simpson et al. 1987). Celá sekvence byla publikována v roce 1993 (Mulligan et al. 1993, Mulligan et al. 1994). Následně byly objeveny mutace spojené s agresivnějšími formami familiárního MTC (Donis-Keller et al. 1993, Mulligan et al. 1993, Hofstra et al. 1994). V souvislosti s MEN 2B bylo zjištěno majoritní postavení mutace Met918Thr v 16. exonu *RET* proto-onkogenu, která způsobuje

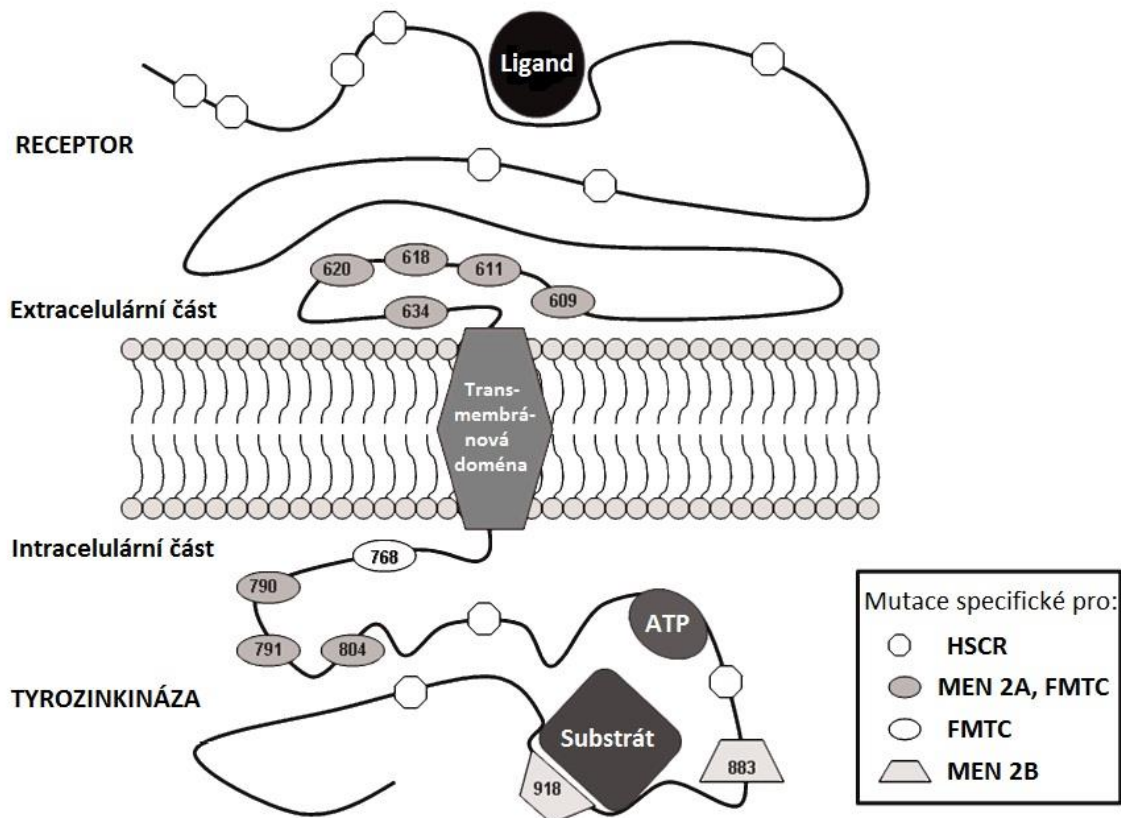
konstitutivní aktivaci receptoru bez přítomnosti ligandu a bez nutnosti dimerizace receptoru. Mutace v cysteinových kodónech 609, 611, 618, 620, 630, 634 v 10. a 11. exonu byly shledány podstatnými v manifestaci MEN 2A/FMTC. Tyto mutace způsobují dimerizaci RET receptoru (bez přítomnosti ligandu) a tím aktivaci signálační dráhy. Poté se hledání zárodečných mutací rozšířilo i do dalších exonů a v letech 1995-1998 byly detekovány mutace ve 13., 14. a 15. exonu v kodónech 768, 790, 791, 804 a 891, které jsou převážně sdružené s FMTC a mírnějšími projevy onemocnění (Obr. 12).



**Obr. 12** Schéma *RET* proto-onkogenu s lokalizací zárodečných mutací specifických pro MTC

Odlíšné mechanismy aktivace mutovaného RET tyrozinkinázového receptoru se odrážejí v korelaci genotypu s fenotypem. Různé mutace se významně liší svou agresivitou a fenotypem onemocnění a rizikem onemocnění pro nositele mutace (Obr. 13). Dle výsledovaných poznatků byla postupně vypracována a zdokonalována klasifikace zárodečných mutací, které byly rozříděny do tří kategorií dle jejich rizikovosti (Tab. 3) na (a) mutace s nejvyšším rizikem lokalizované v katalytickém jádře intracelulární domény, (b) mutace s vysokým rizikem nacházející se v cystein-bohaté extracelulární doméně a (c) mutace s vyšším rizikem umístěné v tyrozinkinázové intracelulární doméně.

Z jednotlivých rizikových skupin vyplývají doporučení pro rodiny s familiární formou MTC, při čemž American Thyroid Association ještě vyhradila samostatnou rizikovou kategorii pro mutaci v kodónu 634, která se jeví jako mnohem agresivnější než mutace v dalších cysteinových kodónech (Brandi et al. 2001, de Groot et al. 2006, Kloos et al. 2009, Machens et al. 2012).



**Obr. 13** Nejčastější zárodečné *RET* mutace ve vztahu k mechanismu aktivace (podle Fialkowski et al. 2006)

Screening rizikových exonů se stal základem pro dnes již rutinní molekulárně genetickou analýzu v rodinách s MTC. Přesto některé rodiny s familiární formou MTC nebyly rozřešeny a příčina dědičného onemocnění zůstává nenalezena, i když u těchto rodin byl proveden screening celého *RET* proto-onkogenu. U několika rodin ale pátrání v dalších exonech bylo úspěšné, zvláště v kodónu 533 v 8. exonu, kde byla mutace nalezena u řeckých a brazilských pacientů (Da Silva et al. 2003, Peppas et al. 2008, Castro et al. 2013). Zaslouhou našeho pracoviště byla v české rodině s FMTC objevena mutace

Gly321Arg v 5. exonu (Dvořáková et al. 2005, Václavíková 2006). Jako reakce na tuto zjištění byla přijata nová mezinárodní doporučení pro screening zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu. Kromě šesti dosud testovaných exonů bylo doporučeno rozšířit genetickou analýzu i o 5. a 8. exon, buď jako součást rutinního vyšetření nebo jako cílové místo hledání u rodin s nenalezenou mutací při základním screeningu (de Groot et al. 2006).

**Tab. 3** Klasifikace zárodečných mutací a doporučení (Kloos et al. 2009, Machens et al. 2012, Raue et al. 2012)

Riziková kategorie a agresivita mutace	<i>RET</i> genotyp		Nejnižší popsáný věk manifestace onemocnění			Věk nositele mutace, ve kterém je doporučeno provést profylaktickou TTE/začít se screeninem		
	Exon	Kodón	MTC	FEO	pHPT	Profylaktická TTE	Screening FEO	Screening pHPT
D Nejvyšší	16	918	0,2	12	-	≤ 1	8	-
	15 <sup>1</sup>	883 <sup>1</sup>	39	39	?			
C Vyšší	11	634	0,8	12	5	< 5	8	8
	10	609	4	19	34			
B Vysoká	10	611	7	30	40	< 5 <sup>3</sup>	20	20
	10	618	5	19	41			
	10	620	5	19	?			
	11 <sup>1</sup>	630 <sup>1</sup>	1	?	32			
	11	631	?	?	?			
A Mírná	8	533	21	35	?	5-10 <sup>3</sup>	20	20
	11	649 <sup>4</sup>	?	?	?			
	13	768	9	59	?			
	13	790	10	28	?			
	13	791 <sup>4</sup>	15	38	38			
	14	804	6	28	54			
	15	891	39	39	?			
		další <sup>2</sup>						

FEO – feochromocytom; pHPT – primární hyperparathyreóza

<sup>1</sup> pravděpodobně budou přeřazeny do jiné kategorie (630 do C, 883 do A)

<sup>2</sup> mutace v kodónech 321, 515, 531, 532, 600, 603, 606, 635, 666, 776, 777, 819, 833, 844, 861, 866, 912 mohou být variantami neznámého významu, jelikož byly nalezeny v omezeném počtu rodin

<sup>3</sup> TTE může být odložena až po věku 5 let, pokud jsou striktně splněna tato kritéria: normální hladina bazálního a stimulovaného kalcitoninu v krvi, normální sonografický nález, méně agresivní projevy onemocnění v rodině, rodinné preference

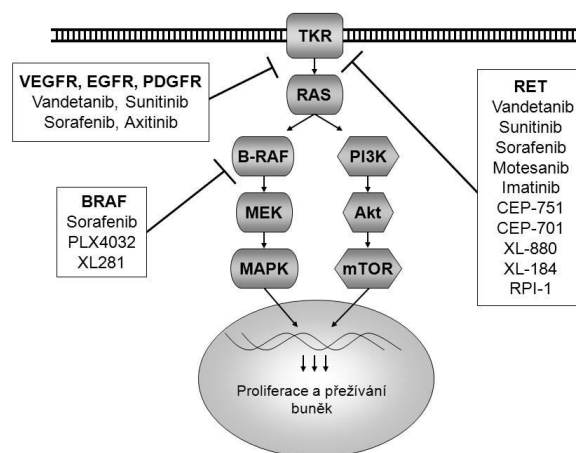
<sup>4</sup> mutace v kodónech 649 a 791 mohou být dle posledních studií benigní varianty (Erlic et al. 2010, Prazeres et al. 2011, et al. Toledo 2015)

Některé zárodečné mutace, zvláště mutace v nejnižší rizikové skupině, jsou exprimovány s různou penetrancí a fenotypovými projevy. Také mutace, které byly nově nalezeny v ostatních exonech *RET* proto-onkogenu, často třeba jen u jedné rodiny s MTC, jsou většinou spojeny s mírnějšími projevy onemocnění. U nově objevených mutací je vhodné provést funkční studie a ověřit, zda jsou opravdu kauzální. Vzhledem k nízké penetranci, fenotypické heterogenitě a variabilitě věku onemocnění u těchto mutací se hledají jiné genetické změny v *RET* proto-onkogenu a jiné geny, které by se mohly podílet na vzniku a modulaci klinického projevu MTC. Spekuluje se o významu polymorfismů, zejména ve 2., 7., 11., 13., 14. a 15. exonu a intronických variant v *RET* proto-onkogenu, které mohou dle některých publikací predisponovat k rozvoji MTC či modifikovat fenotypické projevy (Lesueur et al. 2006, Ceolin et al. 2012, Lantieri et al. 2013). Dalšími kandidátními geny jsou ligandy a koreceptory *RET* proto-onkogenu (GDNF, NRTN, ARTN, PSPN, GRF $\alpha$ -1-4), kde by mutace a polymorfismy mohly ovlivnit jejich funkci a aktivaci signální dráhy. Ve španělské asociační studii (Ruiz-Llorente et al. 2007) bylo identifikováno 7 dalších genů s nízkou penetrancí, jejichž polymorfismy asociovaly s rizikem sporadického MTC. Tyto geny kódují proteiny z *RET* signalizační kaskády (CDKN2B), nebo jsou zahrnuty v dějích, ve kterých *RET* participuje - v apoptóze (BLC2), přenosu signálu (COMT, H-RAS, AURKA) či v regulaci buněčného cyklu (CDK6, STAT1).

V případě sporadického medulárního karcinomu jsou příčinou onemocnění genetické alterace přítomné pouze v nádoru, tedy na potomstvo nepřenosné. Somatické mutace v nádorové tkáni bývají přítomné u 43-65 % pacientů se sporadickou formou MTC, většinou se jedná o mutaci Met918Thr v 16. exonu, ale výjimkou nejsou ani bodové mutace či delece cysteinových kodónů v 10. a 11. exonu *RET* proto-onkogenu. U 11-43 % pacientů byly v nádorové tkáni nalezeny i somatické mutace v *H-RAS*, *K-RAS* a *N-RAS* genech (Moura et al. 2011, Boichard et al. 2012, Ciampi et al. 2013).

Objasnění genetických příčin vzniku MTC je podstatné nejen kvůli predikci onemocnění u asymptomatických jedinců a zpřesnění diagnózy a prognózy onemocnění u pacienta, ale v budoucnu může také přispět k cílené genové terapii. Pomoci ní bude možné selektivně zacílit terapeutické geny do nádorových buněk aplikací tkáňově specifických promotorů, (např. kalcitoninového promotoru), čímž dojde ke snížení mimonádorové toxicity.

Možnosti jsou zatím testovány zejména in vitro na tkáňových kulturách nebo na zvířecích modelech (Castellone et al. 2008, Ceratto et al. 2009). Další studované přístupy genové terapie pak mohou pomoci při blokaci tyrozinkinázové funkce; jedná se o korektivní genovou terapii (obnovení normální funkce mutovaného genu či zamezení jeho účinku expresí dominantně-negativní RET mutanty), cytoreduktivní genovou terapii (vpravení exogenního „sebevražedného“ genu) a imunomodulační genovou terapii (indukce genové exprese, která zvyšuje imunitní odpověď proti nádorové tkáni). Také molekulárně cílená léčba je založena na inhibici proteinů a signálních drah, které jsou vlivem mutace abnormálně aktivovány, popř. signálních drah, které podporují růst nádoru. Mechanismus inhibitorů tyrozinkináz (TKI) spočívá v blokaci ATP vazebných míst kinázy a tedy zabránění vazbě ATP, autofosforylace a aktivace tyrozinkinázy. TKI mohou působit i na více tyrozinkináz, jelikož vazebné místo pro ATP je velice konzervativní. Některé preparáty již v minulém roce vstoupily do klinické praxe u českých pacientů s metastatickými stadii MTC (vandetanib, cabozantinib). Vandetanib je inhibitorem receptoru VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor) a efektivně blokuje fosforylaci RET proteinu nesoucího nejčastější mutace příčinné pro MEN 2A a MEN 2B. Neinhibuje však aktivaci způsobenou mutací v kodónu 804, kterou je však schopný inhibovat jiný TKI - sorafenib (Plaza-Menacho et al. 2007, Santarpia et al. 2009). Tento lék je jinak spíše zaměřen na pacienty s jinými typy nádorů štítné žlázy (PTC, FTC a ATC), ale působením na stejnou signální dráhu je úspěšný i u pacientů s MTC (Obr. 14). U pacientů je tedy vhodné ještě před zahájením léčby nejprve provést analýzu somatických mutací v nádorové tkáni.

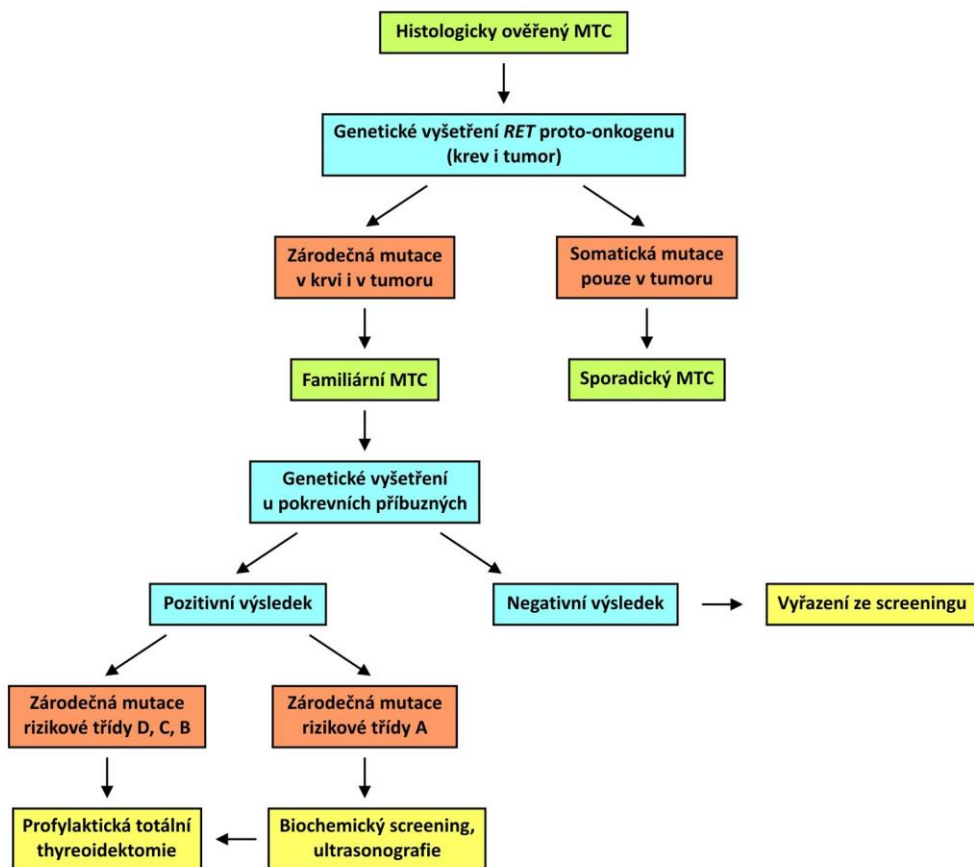


**Obr. 14** Působení inhibitorů na signální dráhy



### 1.3.7 Molekulárně genetický screening a management u pacientů s MTC

Vzhledem k možnostem molekulárně genetického vyšetření se v rodinách s familiární formou MTC zásadně změnila prevence a léčba MTC (Obr. 15). Dříve se u rodinných příslušníků spoléhalo na sledování hladin kalcitoninu v krvi a v případě pozitivního screeningu byla indikována profylaktická TTE. Zvýšené hodnoty kalcitoninu však již ukazují na probíhající aktivitu nádorového procesu. Dnes má nejdůležitější úlohu právě molekulárně genetické vyšetření, na jehož základě je možné predikovat vznik onemocnění v preklinickém stadiu. Jedinci, u kterých se nepotvrdí zárodečná mutace detekovaná v rodině, mohou být ze sledování zcela vyřazeni. Naopak u nositelů mutace se může přistoupit k preventivnímu odstranění štítné žlázy ještě před rozvojem onemocnění.



Obr. 15 Schéma diagnostiky MTC

Systematicky by měli být screenováni všichni pacienti s MTC, protože ani sporadický MTC (manifestace u 1 členy rodiny) nevylučuje zárodečnou mutaci *de novo* či nevědomost pacienta a lékaře o familiární formě MTC v rodině. I mezi sporadickými případy tak bývá záchyt zárodečné mutace ve 4-10 % (Elisei et al. 2007). Neinformativní výsledek vyšetření, kdy nebyla detekována žádná zárodečná mutace v analyzovaných exonech, ještě nemůže zcela vyloučit přítomnost minoritní mutace v některém z dalších exonů. Avšak tato pravděpodobnost je téměř zanedbatelná, jelikož 98 % mutací bývá zachyceno právě v osmi rizikových exonech (Raue et al. 2012). Přesto k potvrzení sporadického výskytu MTC je optimální provést genetickou analýzu z nádorové tkáně. Přítomnost somatické mutace v *RET* proto-onkogenu (a nepřítomnost zárodečné mutace) vyvrátí dědičnou formu MTC a riziko pro rodinné příslušníky.

Zvlášť významným aspektem je načasování profylaktické operace u asymptomatických nositelů mutace. Pokyny pro profylaktickou TTE zohledňují záchyt nejmladších pacientů s histologicky potvrzeným MTC. MTC byl zastižen již u 2měsíčního pacienta s mutací v kodónu 918, 10měsíčního pacienta s mutací v kodónu 634, 12měsíčního pacienta s mutací v kodónu 630, 4-7letých pacientů s mutacemi v cysteinových kodónech 10. exonu a u 9-39letých pacientů s mutacemi v 8., 13., 14. a 15. exonu (Machens et al. 2012). Proto doporučení pro TTE jsou věkově velice přísná, ale bylo pozorováno, že jedině velice časná TTE může zabránit rekurenci onemocnění a metastázám v krčních lymfatických uzlinách (Skinner et al. 2005). Stejně tak je navržen i screening přítomnosti feochromocytomu a primární hyperparathyreózy (Tab. 3).

Na toto téma jsme publikovali několik přehledových článků, které jsou in extenso uvedeny v přílohách.

**Příloha č. 1:** Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, Vlček P, Škába R. Nádory štítné žlázy a Hirschsprungova choroba: Desetileté zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou *RET* proto-onkogenu. *Vnitř Lék* 2006; 52(10): 926-934.

**Příloha č. 2:** Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Vlček P. Mnohočetná endokrinní neoplazie typ 2 - syndrom MEN 2A. *Klin Onkol* 2009; 22 Suppl: S28-S31.

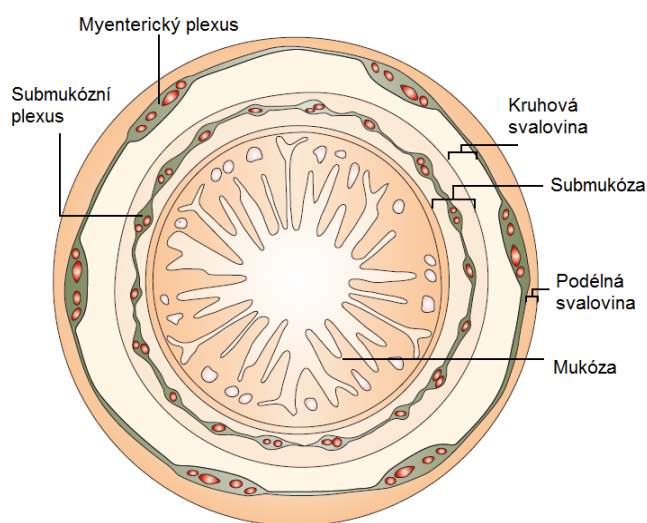
**Příloha č. 3:** Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, Hálková T, **Václavíková E**. Genetika nádorů štítné žlázy a jejich molekulárně cílená léčba. *Onkologie* 2011; 5(6): 325-328.

**Příloha č. 4:** Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, **Václavíková E**, Hálková T. Nádory štítné žlázy – molekulárně genetické příčiny a možnosti cílené léčby. *Čas lék čes* 2012; 151(3): 123-127.

**Příloha č. 5:** Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, Hálková T, Bendlová B. Hereditární karcinomy štítné žlázy a jejich molekulární diagnostika. *Česk Patol* 2014; 50(2): 81-86.

## 1.4 Hirschsprungova choroba

Hirschsprungova choroba (HSCR), též megacolon congenitum, je vrozené onemocnění enterického nervového systému, které je charakterizováno absencí gangliových buněk submukózního Meissnerova a myenterického Auerbachova plexu podél variabilní délky distálního gastrointestinálního traktu (Obr. 16).



**Obr. 16** Průřez střevem s vyznačením submukózního a myenterického plexu (podle Heanue 2007)

Etiopatogenetická příčina HSCR spočívá především v defektu migrace neuroblastů, které mají svůj původ v neurální liště, a přispívá i porucha diferenciace neuroblastů v gangliové buňky a jejich urychlený zánik. Onemocnění tak patří stejně jako např. MTC a feochromocytom mezi jednoduché neurokristopatie. Migrace neuroblastů probíhá v kraniokaudálním směru z jícnu až do análního kanálu během 5. – 12. gestačního týdne. Rozsah postižení střeva se odvíjí od toho, v jaké fázi těhotenství dojde k přerušení migrace. Čím dříve k poruše dojde, tím delší úsek střeva je bez inervace. Vždy ale zahrnuje rektoanální ohbí a postupuje proximálně. Nejlehčí formou HSCR (10 % pacientů) je ultrakrátká forma, kdy je postižen pouze ultrakrátký segment (UKS), tj. několikacentimetrová distální část rekta. Nejčastější formou (75 %) je klasická rekto-sigmoideální forma (RS-HSCR) dosahující esovité kličky (sigmoidea). Dlouhá forma (LCA – long colonic aganglionosis) pak zasahuje větší část tlustého střeva, často pod lienální ohbí,

a v případě totální aganglionózy tlustého střeva (TCA – total colonic aganglionosis) je postiženo celé tlusté střevo a část terminálního ilea (8-10 % pacientů). Existují i velice vzácné diseminované formy, kdy je postižena také část tenkého střeva (NTSBA - nearly total small bowel aganglionosis) či dokonce celé tenké střevo (TIA – total intestinal aganglionosis) (Holschneider et al. 2000, Amiel et al. 2008).

#### **1.4.1 Epidemiologie HSCR**

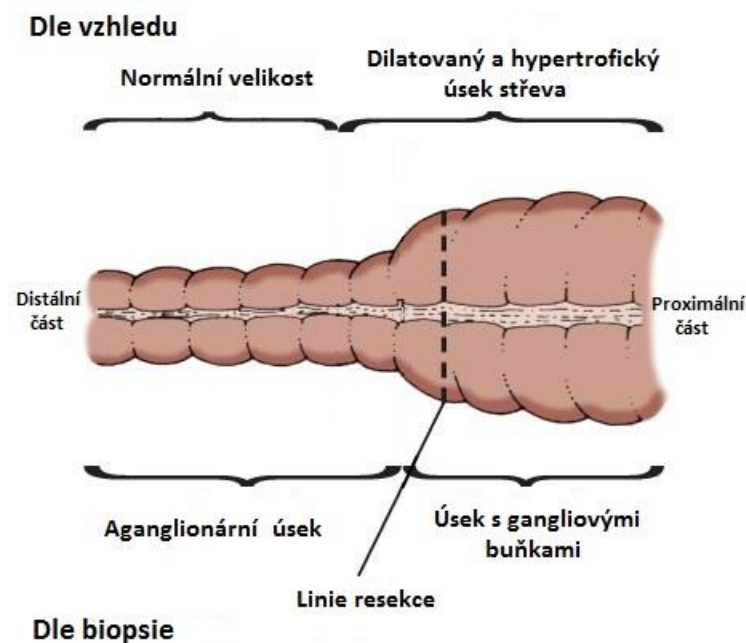
HSCR se vyskytuje cca u 1 z 5000 novorozenců, avšak incidence se mírně liší mezi etnickými skupinami. Z genetického pohledu rozeznáváme frekventovanější krátkou (S-HSCR, 80 %) a dlouhou (L-HSCR, 20 %) formu onemocnění. Chlapci jsou postiženi 4x častěji než dívky, ale u L-HSCR je tato převaha pouze v poměru 2:1. U potomků pacientů s S-HSCR mají chlapci 5 % riziko onemocnění, dívky 1-3 %. Probandi s L-HSCR předávají svým potomkům riziko mnohem vyšší (9-33 %) (Amiel et al. 2008).

#### **1.4.2 Historie HSCR**

První zmínky o Hirschsprungově chorobě se datují již k r. 1691, kdy holandský anatom Fredericus Ruysch popsal případ enormní dilatace tlustého střeva jako příčinu smrti 5letého děvčátka. Onemocnění dostalo své jméno po dánském pediatru Haraldu Hirschsprungovi, který v r. 1888 publikoval případ dvou chlapců, kteří zemřeli na chronickou zácpu a abdominální distenzi jako následek vrozeného megakolonu. Ve 40. letech 20. století bylo zjištěno, že příčina nemoci spočívá v absenci intramurálních gangliových buněk submukózního a myenterického plexu za dilatovaným úsekem střeva. První chirurgická léčba byla navržena a provedena v r. 1948 americkým chirurgem Orvarem Swensonem. Jeho chirurgický postup se spolu s dalšími modifikacemi dle doktorů Soavea, Duhamela a Boleye používá v různých obměnách dodnes. Dlouhodobé přežití pacientů díky úspěšné léčbě následně odhalilo přenos onemocnění z rodičů na potomky (Holschneider et al. 2000, Amiel et al. 2008).

### 1.4.3 Symptomy HSCR

Absence gangliových buněk v daném úseku střeva způsobí jeho zúžení a ztrátu motility, které brání vyprázdnění úseku nad ním, střevo zde pak dilatuje, tvoří megakolon a dochází k obstrukci (neprůchodnosti) střeva (Obr. 17). HSCR je diagnostikována buď záhy po narození pacienta, nebo v batolecím věku, většinou však do věku 2 let. Pokud je ale postižený úsek krátký (např. UKS), mohou vzácně obtíže nastat až v dospělosti, kdy se projeví těžkou obstipací. Typickým klinickým příznakem u novorozence je, že smolka neodejde v obvyklé době (do 48 hod po porodu), novorozenec špatně přijímá potravu, zvrací, má vzedmuté břicho, žloutenku, průjem, nadýmání a nepřibývá na váze. U starších dětí se onemocnění projevuje chronickou zácpou, vzedmutým břichem, poruchou růstu, podvýživou a pacient neprospívá. Velice důležitá je včasná diagnóza, aby nenastaly vážné komplikace – enterokolitida nebo ruptura tlustého střeva, což jsou nejčastější příčiny úmrtí pacientů s HSCR. Úmrtnost bývá od 80. let 20. století pod 6 % (Škába 2003, Kessmann 2006, Mihál et al. 2009).



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc.  
All rights reserved.

**Obr. 17** Dilatované střevo nad aganglionárním úsekem

#### **1.4.4 Diagnostika a léčba HSCR**

Hlavní úlohu při diagnostice HSCR mají zobrazovací metody spolu s manometrickým vyšetřením. Při manometrickém vyšetření se zjišťuje, zda chybí rektosfinkterický reflex. Rentgenové kontrastní vyšetření tlustého střeva (irigografie) zase zobrazí zúžený postižený aganglionární úsek, nad kterým se střevo nálevkovitě rozšiřuje. Při tomto vyšetření je ovšem první 3 měsíce života pacienta nález normální, výjimky mohou představovat někteří pacienti s TCA. Teprve potom začíná dilatační proces. K potvrzení diagnózy se následně provádí biopsie rektální sliznice a submukózy sací sondou, čímž se prokazuje absence gangliových buněk a přítomnost zbytnělých parasympatických nervových vláken, která mají pozitivní reakci na acetylcholinesterázu. Léčba se provádí chirurgicky, a to resekcí aganglionárního úseku střeva s následnou kolorektoplastikou. Resektát je poslán na histologické vyšetření. Se správnou léčbou většina pacientů nemá dlouhotrvající nepříznivé projevy onemocnění a může vést téměř normální život. Pacienti by ale měli být po mnoho let monitorováni kvůli riziku enterokolitidy. Enterokolitida se objeví u 17-50 % pacientů. U většiny z nich vznikne do dvou let po chirurgické léčbě, především kvůli obstrukci střeva a zbytku aganglionárního úseku. Jsou ale známy případy enterokolitidy i po 10 letech po léčbě, tudíž dlouhodobý screening je důležitý (Škába 2003, Kessmann 2006, Mihál et al. 2009).

#### **1.4.5 Genetické příčiny HSCR**

HSCR se v 70 % vyskytuje jako izolované nesyndromické onemocnění, a to především sporadicky (80 %) nebo familiárně (20 %). Izolovaná HSCR představuje multifaktoriální, polygenní onemocnění s nekompletní penetrancí dependentní na pohlaví a variabilní expresivitou v závislosti na délce postiženého úseku, s principy nemendelovské dědičnosti. Mendelovská dědičnost se naopak uplatňuje u syndromické HSCR, kdy je HSCR součástí různých syndromů (Tab. 4). Ve 12 % případů je nemoc spojena s chromozomálními abnormalitami, z nichž v 90 % je doprovázena trizomií 21 (Downův syndrom), a 18 % pacientů má i jiné vrozené anomálie (Moore 2006). Trizomie 21 (Downův syndrom) se nalézají až u 10 % pacientů s HSCR. Některé studie popisují u 5-30 %

pacientů s HSCR další vrožené izolované anomálie (kardiovaskulární, urologické, neurologické, gastrointestinální) (Amiel et al. 2008, Wallace et al. 2011). U L-HSCR je navrhován dominantní či aditivní model dědičnosti, zatímco pro S-HSCR spíše recesivní či multifaktoriální model dědičnosti. Do dnešní doby bylo objeveno 15 genů (*RET*, *GDNF*, *NTN*, *GFRA1*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*, *SOX10*, *ZFHX1B (SIP1)*, *PHOX2B*, *KIAA1279/KBP*, *TCF4*, *TTF-1*, *NRG1*, *NTRK3*) a 5 chromozomálních lokusů (3p21, 4q31-32, 9q31, 16q23.3, 19q12) segregujících s HSCR (Amiel et al. 2008, Miao et al. 2010).

**Tab. 4** Syndromická a nesyndromická HSCR

		<b>Gen (chromozomální lokus)</b>	
<b>Izolovaná HSCR</b>			<i>RET</i> (10q11.2)
			<i>GDNF</i> (5p13)
			<i>NTN</i> (19p13)
			<i>EDNRB</i> (13q22)
			<i>EDN3</i> (20q13)
			<i>ECE1</i> (1p36)
			<i>SOX10</i> (22q13)
			<i>PHOX2B</i> (4p12)
			<i>ZFHX1B=SIP1</i> (2q22)
			<i>TCF4</i> (18q21)
		<i>KIAA1279</i> (10q21.1)	
<b>Chromozomální abnormality</b>		Downův syndrom, trisomie 21	
		delece 10q11.2	<i>RET</i>
		delece 13q22	<i>EDNRB</i>
		delece 2q22-q23	<i>ZFHX1B</i>
		delece 17q21	?
		duplikace 17q21-q23	?
	triplikace 22pter-q23	?	
<b>Syndromická HSCR</b>		MEN2	<i>RET</i>
	<b>neurokristopatie</b>	Waardenburgův-Shahův syndrom	<i>EDNRB</i> , <i>EDN3</i> , <i>SOX10</i>
		Haddadův syndrom	<i>PHOX2B</i>
	<b>bez neurokristopatie</b>	Goldbergové-Shprintzenův syndrom	<i>KIAA1279</i>
		Mowatův-Wilsonové syndrom	<i>ZFHX1B</i>
		Cartilage-hair hypoplasia	
	<b>vzácné</b>	Bardetův-Biedlův syndrom	
		Kaufmanův-McKusickův syndrom	
		Smithův-Lemliho-Opitzův syndrom	
		Werner mesomelic dysplasia	
Clayton-Smithův syndrom			



Majoritní roli zde ovšem hraje *RET* proto-onkogen lokalizovaný na chromozomu 10q11.2, známý spíše ve spojitosti s aktivujícími mutacemi způsobujícími syndromy MEN 2 a FMTC. V patogenezi HSCR se uplatňují naopak mutace inaktivující, detekované u 50 % pacientů s familiární formou HSCR a u 15-20 % pacientů se sporadickým výskytem. Mnohem vyšší záchyt mutací (70-80 %) byl zaznamenán u L-HSCR, zvláště TCA, oproti S-HSCR (17-38 %) (Amiel et al. 2008). Souvislost HSCR s *RET* proto-onkogenem byla objevena v r. 1993 za pomoci vazebných analýz v postižených rodinách poté, co byla rok předtím zjištěna delece v oblasti 10q11.21-q21.2 u dívky s TCA a mentální retardací (Martucciello et al. 1992, Angrist et al. 1993, Lyonnet et al. 1993). Následně bylo identifikováno velké množství alterací po celé délce *RET* proto-onkogenu včetně velkých delecí, mikrodelecí, insercí, nesmyslných, záměnných a sestřihových mutací.

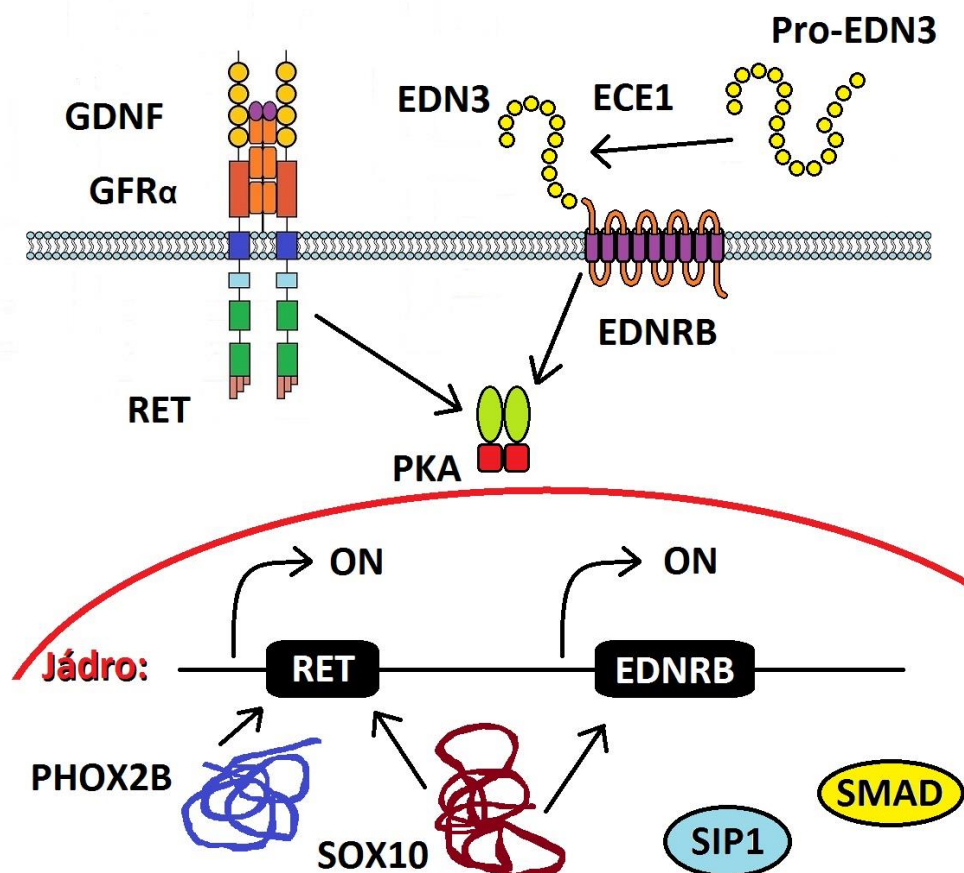
Bylo také vysvětleno, proč je ve vzácných případech HSCR asociována s MEN 2/FMTC. Příčinou jsou mutace v 10. exonu *RET* proto-onkogenu v cysteinových kodónech 609, 611, 618 a 620, které mohou být zároveň aktivující a inaktivující v závislosti na tkáni, kde se *RET* protein exprimuje. Jejich duální charakter, který jim přidelil označení „Janusovy mutace“ podle římského boha se dvěma tvářemi, způsobí, že ve štítné žláze a v nadledvině je nekontrolovatelně aktivována signalizační kaskáda a spuštěn nádorový proces, zatímco důsledkem inaktivujícího charakteru mutace ve střední inervaci je sníženo množství *RET* proteinu a dochází k jeho haploinsuficienci. To může být dle jedné hypotézy způsobeno tím, že proteinové izoformy obsahující tyto specifické mutace pronikají na buněčný povrch s velmi malou účinností a *RET* proteinu je nedostatek. Další teorií je nastartování apoptózy v buňkách embryonálního enterického ganglia jako odpovědi na nepatřičný mitogenní signál způsobený mutovanou alelou *RET* proto-onkogenu (Takahashi et al. 1999, Arighi et al. 2004). Riziko sdružení obou onemocnění se vyskytuje u obou forem HSCR, i když u dlouhých forem je vyšší. Vznik MTC hrozí nejméně 5 % pacientů s detekovanou mutací v *RET* proto-onkogenu. Screening zárodečných mutací 10. exonu je důrazně doporučován zvláště u pacientů s TCA (Moore et al. 2012).

Přestože záchyt mutací v *RET* proto-onkogenu není vysoký, vazebné analýzy odhalily spojení s *RET* proto-onkogenem u 90 % rodin s HSCR (Burzynski et al. 2005, Crockett et al. 2011). Kódující mutace by tak nemusely být pro vznik HSCR dostatečným impulzem, pro

což svědčí nekompletní penetrance mutovaných alel. Je možné, že k expresi onemocnění je potřeba interakce několika genů. Zvažuje se také zapojení běžných jednonukleotidových variant v *RET* proto-onkogenu či jejich určitých kombinací, tzv. haplotypů, které mohou mít funkci genetických modifikátorů a ovlivňovat expresi proteinu. Rovněž mohou být ve vazbě s dosud neznámým příčinným lokusem, který je v blízkosti *RET* proto-onkogenu (Dvořáková et al. 2013). Některé studie prokázaly vazbu HSCR s haplotypem v *RET* proto-onkogenu lokalizovaným ve vysoce konzervované oblasti zvané MCS+9.7 (Multispecies conserved sequence). Oblast začíná 4 kb před transkripčním startovním místem *RET* proto-onkogenu a končí na začátku 2. exonu (Burzynski et al. 2005, Emison et al. 2010).

V patogenezi HSCR se vzácně uplatňují i geny kódující další proteiny signalizační dráhy *RET/GDNF*. Alterace byly u několika pacientů nalezeny v genech pro dva ligandy *RET* proto-onkogenu – *GDNF* a *NTN* – a v genu pro koreceptor *GFR $\alpha$ 1*. Většinou ale byly tyto mutace nalezeny společně s mutací v *RET* genu nebo trizomií 21, proto se zdá, že samotné nejsou dostačující pro vznik HSCR. Také endothelinová signalizační dráha, regulující migraci neuroblastů, jejich proliferaci a diferenciaci, sdružuje několik proteinů spojovaných s HSCR. Je jím endothelinový receptor B (*EDNRB*), jeho ligand endothelin 3 (*EDN3*) a ECE 1 (endothelin converting enzyme) přeměňující prekurzor *EDN3* na aktivní peptid (Obr. 18). Mutace v *EDNRB* a *EDN3* jsou detekovány u 5 % pacientů s HSCR a vyskytují se kromě izolované HSCR i v rámci syndromické HSCR spolu s Waardenburgovým syndromem, což je autosomálně dominantně dědičné onemocnění spojené s postižením sluchu, změnami v pigmentaci vlasů, kůže a očí a charakteristickou fysiognomií. Do patogeneze izolované i syndromické HSCR se zapojují také transkripční faktory exprimované buňkami neurální lišty a ovlivňující zmíněné signalizační dráhy *RET/GDNF* a *EDN3/EDNRB*. Patří sem transkripční faktor *SOX10* (*SRY* (sex determining factor)-like region Y-box10) regulující expresi *RET* a *EDNRB*, jehož mutace byly také u několika pacientů spojeny kromě HSCR i s Waardenburgovým syndromem, a *PHOX2B* (pair-like homeobox 2b) regulující expresi *RET*, jehož mutace byly detekovány u pacientů s HSCR a Haddadovým syndromem (vrozený centrální hypoventilační syndrom). Dalšími popsány transkripčními faktory jsou *ZFX1B* (zinc finger homeodomain), známý také pod názvem *SIP1* (*SMAD* interagující protein), který bývá spojován s Mowat-Wilsonové

syndromem (HSCR, těžká mentální retardace, mikrocefalie, epilepsie, opožděný motorický vývoj, faciální postižení, srdeční vada, urogenitální anomálie), a *KIAA1279/KBP* (kinesin-binding protein), kde byly mutace zaznamenány v souvislosti se syndromem Goldbergové-Shprintzenovým (mírná mentální retardace, HSCR, mikrocefalie, rozštěp patra, hypotonie, malý vzrůst, silné řasy a řídké vlasy). V souvislosti s HSCR bylo popsáno ještě mnoho dalších syndromů a také několik chromozomálních anomálií (Amiel et al. 2008, Wallace et al. 2011).



Obr. 18 Signalizace u HSCR

Příloha č. 6: Dvořáková Š, Václavíková E, Škába R, Kavalcová L, Bendlová B. Hirschsprungova choroba a její genetické příčiny. *Čes-slov Pediat* 2013; 68(3): 167-176.

## 2. Cíle

1. Detekce hlavních genetických alterací u medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby.
2. Studium role polymorfismů v *RET* proto-onkogenu jako modifikujících faktorů v patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby.
3. Studium vztahu mezi genetickými změnami a jejich fenotypickými projevy u pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy a pacientů s Hirschsprungovou chorobou.

Předpokladem splnění těchto cílů bylo

- a) pokračovat ve shromažďování DNA banky souborů pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy, pacientů s Hirschsprungovou chorobou a členů jejich rodin
- b) tvorba databáze klinicko-patologických dat
- c) kompletace souboru zdravých kontrol

### **3. Metody**

#### **3.1 Studované soubory**

Studie byly schváleny Etickou komisí Endokrinologického ústavu a Fakultní nemocnice v Motole. Všichni pacienti, popř. jejich zákonní zástupci, a všichni dobrovolníci podepsali informovaný souhlas s genetickou analýzou.

##### **3.1.1 Soubor pacientů s MTC**

Náš soubor pacientů s MTC zahrnuje 490 českých nepříbuzných rodin čítajících 490 pacientů s MTC (prvozáchyt v rodině) a 381 testovaných příbuzných v riziku onemocnění. Dle jejich fenotypu je můžeme klasifikovat na rodiny s MEN 2B (9), MEN 2A (14), FMTC (16) a pacienty se sporadickým MTC (451). Za rodinu s FMTC je na našem pracovišti pokládána rodina, kde byla diagnóza MTC, popř. hyperplázie C-buněk (CCH), potvrzena minimálně u 2 členů rodiny. Mezinárodní pravidla jsou přísnější, požadují 4 postižené a více. Soubor pacientů se sporadickým MTC zahrnuje pacienty, u nichž byl předpokládán sporadický výskyt MTC, neboť se jedná o prvozáchyt MTC v rodině. U některých pacientů byl na základě záchytu zárodečné mutace *RET* genu sporadický výskyt vyloučen, avšak kritéria FMTC zatím nesplňují a zůstávají zařazeni jako „zdánlivě“ sporadické případy. Pacienti byli do souboru začleněni na základě zvýšených hladin bazálního a stimulovaného kalcitoninu, ale především cytologicky a pooperačně histologicky potvrzené přítomnosti MTC, popř. CCH. Za dobu řešení disertační práce (2006-2015) se soubor rozrostl o 342 pacientů s MTC a 99 jejich příbuzných v riziku onemocnění.

##### **3.1.2 Soubor pacientů s HSCR**

Naše DNA banka shromažďuje 214 pacientů s HSCR a 26 členů vyšetřovaných rodin. Soubor je klasifikován dle fenotypu onemocnění, tj. délky postiženého úseku střeva, na pacienty s nejčastější krátkou (rekto-sigmoideální) formou HSCR (139) a dlouhou formou HSCR (58) včetně 27 pacientů s totální aganglionózou tlustého střeva (TCA),

5 pacientů s NTSBA a 2 pacientů s TIA. Pacienti byli ke genetickému vyšetření vybíráni prospektivně, tzn. pacienti operovaní na Dětské chirurgii ve FN v Motole od r. 2003 dodnes (121), ale i retrospektivně (93 pacientů operovaných od r. 1979 do r. 2003) s důrazem na závažnější formy onemocnění. Za dobu řešení disertační práce (2006-2015) se soubor rozrostl o 160 probandů a 19 příbuzných.

### **3.1.3 Kontrolní soubor**

Do kontrolního souboru, který byl nezbytný v rámci naší studie polymorfismů pro porovnání s pacienty s MTC a HSCR, bylo zařazeno 205 zdravých osob, 95 mužů a 110 žen, v jejichž rodinné anamnéze nebyla shledána žádná onemocnění štítné žlázy ani Hirschsprungova choroba. Tito zástupci běžné populace se dobrovolně zúčastnili výzkumných projektů prováděných na Endokrinologickém ústavu a souhlasili s genetickou analýzou.

### **3.1.4 Klinicko-patologická data**

Ke korelaci zjištěných genetických změn s fenotypovými projevy onemocnění jsou získávána podrobná klinicko-patologická data. U pacientů s MTC se zjišťuje pohlaví, věk, hladiny bazálního a stimulovaného kalcitoninu před a po operaci, velikost tumoru, přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách a vzdálených metastáz, multifokalita nádoru a recidiva onemocnění. Podle klinických a histologických zpráv je na základě 7. edice UICC/AJCC TNM klasifikace určeno TNM stadium. U pacientů s HSCR se kromě věku a pohlaví zjišťuje forma onemocnění čili délka a lokace aganglionárního úseku střeva a přítomnost onemocnění v rodině.

## **3.2 Molekulárně genetická analýza**

### **3.2.1 Izolace DNA**

V průběhu předešlých let byla na našem pracovišti izolována DNA z periferní krve pomocí několika různých metodik. V současné době je izolace DNA založena na principu kolonek se silikátovými membránami - QuickGene DNA Blood Kit L (KURABO Industries) a provádí se na poloautomatickém izolátoru DNA QuickGene-610L (FujiFilm). Po lýze buněk se uvolněná DNA v přítomnosti chaotropních solí a ethanolu zachytí na membráně kolonky. Kolonka se následně opakovaně promývá vhodným puftrem, čímž se odstraní zbytky proteinů a další nežádoucí/kontaminující příměsi. Již čistá DNA se v posledním kroku z membrány uvolní elučním puftrem. Po změření koncentrace a ověření čistoty (poměr absorbancí DNA 260 nm/proteiny 280 nm) byly roztoky DNA naředěny na pracovní koncentraci 10 ng/μl a použity pro amplifikaci DNA.

Izolace DNA ze zamražené odoperované nádorové tkáně se provádí Trizolovou izolací dle firemního návodu (Invitrogen). Z jedné izolace je možné získat v dobré kvalitě DNA i RNA. Během homogenizace Trizol udržuje integritu RNA, lyzuje buňky a rozpouští buněčné komponenty. Směs se rozdělí na dvě fáze po přidání chloroformu a centrifugaci. Mezi horní vodnou fází s RNA a spodní organickou fází obsahující proteiny je vrstva sražené DNA. RNA se z vodné fáze získá vysrážením s izopropylalkoholem a DNA se vysráží přidáním ethanolu. DNA z nádorové tkáně v parafinových bločcích se izoluje pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

### **3.2.2 Sekvenační analýza (Sangerova)**

U pacientů s MTC a HSCR byla v roce 2014 rutinní obousměrná sekvenace šesti rizikových exonů (10., 11., 13., 14., 15., 16.) navýšena o sekvenaci 8. exonu. Sekvenační analýza z kontrolního náběru u pozitivního pacienta a cílová analýza známé mutace u příbuzných pacienta obnáší již pouze analýzu jednoho daného exonu. Ostatní exony byly sekvenovány u vybraných jedinců s preferencí pacientů s podezřením na familiární formu MTC, prvního sta pacientů s HSCR a dále u agresivnějších forem HSCR.

Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) slouží k namnožení úseku DNA. PCR se skládá z 35-40 opakování tří tepelných cyklů (denaturace, hybridizace, elongace). Nejdříve se dvouřetězcová DNA denaturuje (při 94-95 °C), po ochlazení (kolem 60 °C - annealing) dochází k renaturaci a nasednutí oligonukleotidů, které slouží jako primery pro DNA polymerázu při elongaci v třetím kroku (72 °C), a zabudováním nukleotidů začíná syntéza nového řetězce DNA komplementárního s templátem.

**Tab. 5** Protokol pro amplifikaci exonů *RET* proto-onkogenu

Koncentrace MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM	1,5 mM	1,0 mM		2,0 mM
Reagencie	[μl]	[μl]	[μl]	Reagencie	[μl]
Sterilní H <sub>2</sub> O	5,04	5,34	5,64	Sterilní H <sub>2</sub> O	4,2
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,2	0,9	0,6	5x Buffer A	1,5
10x PCR Buffer II	1,5	1,5	1,5	5x Buffer B	1,5
2mM dNTPs	1,2	1,2	1,2	2mM dNTPs	1,5
1μM Primer forward	1,5	1,5	1,5	1μM Primer forward	1,5
1μM Primer reverse	1,5	1,5	1,5	1μM Primer reverse	1,5
AmpliTaQ Gold (5U/μl)	0,06	0,06	0,06	Elongase Enzyme Mix	0,3
DNA (10ng/μl)	3	3	3	DNA (10ng/μl)	3
<b>Celkem:</b>	15	15	15	<b>Celkem:</b>	15

**Tab. 6** Podmínky pro amplifikaci exonů *RET* proto-onkogenu

Exon	Enzym	Konc. MgCl <sub>2</sub> [mM]	Teplota nasednutí primerů [°C]
2	AmpliTaQGold	2,0	61
3	AmpliTaQGold	2,0	61
4	AmpliTaQGold	1,5	72
5	AmpliTaQGold	2,0	61
6	AmpliTaQGold	2,0	61
7	AmpliTaQGold	2,0	61
<b>8</b>	AmpliTaQGold	2,0	57
<b>10</b>	AmpliTaQGold	2,0	61
<b>11</b>	Elongase	2,0	63
12	AmpliTaQGold	2,0	57
<b>13</b>	AmpliTaQGold	1,5	61
<b>14</b>	AmpliTaQGold	1,5	65
<b>15</b>	AmpliTaQGold	2,0	61
<b>16</b>	AmpliTaQGold	2,0	61
17	AmpliTaQGold	2,0	61
18	AmpliTaQGold	1,0	61
19	AmpliTaQGold	2,0	61
20	AmpliTaQGold	2,0	61
21	AmpliTaQGold	2,0	61

Pozn: podmínky pro 1. exon se nepodařilo optimalizovat



Amplifikace exonů *RET* proto-onkogenu využívá dva enzymy - Elongase enzyme Mix (Invitrogen) pro 11. exon a AmpliTaqGold with GeneAmp (Applied Biosystems) pro zbylé exony. Protokol, podmínky reakce a sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 5-7.

**Tab. 7** Sekvence primerů na amplifikaci exonů *RET* proto-onkogenu

Primery na amplifikaci (2. – 11. exon)	Primery na amplifikaci (12. – 21. exon)
2F: 5'-AGT GGC ATT GGG CCT CTA C-3'	12F: 5'-TCT TCT CCC CTT CCC TCA T-3'
2R: 5'-TGC GGA CAC TGA GCT TCT C-3'	12R: 5'-CCC CGG AGA CTC CCC CAG-3'
3F: 5'-ACC GCG GCT TTC CCC TGC T-3'	13F: 5'-AGA AGC CTC AAG CAG CAT CGT C-3'
3R: 5'-CTC CAG GAG CCT GTA GGC-3'	13R: 5'-AGG AGC AGT AGG GAA AGG GAG AAA-3'
4F: 5'-CGA GGA AAG CGG CTG GCC CG-3'	14F: 5'-CAC GAG CAG CAG GAG GCA GAG A-3'
4R: 5'-AAC GAG AAA CGA ACT GTG GCC G-3'	14R: 5'-GAG TGT GGC ATG GTG GGG GAG TGG-3'
5F: 5'-GAC ACC GTG GTG GCC ACG C-3'	15F: 5'-CCC CCG GCC CAG GTC TC-3'
5R: 5'-TAT AGT CAT GTA CGG TCG C-3'	15R: 5'-GCT CCA CTA ATC TTC GGT ATC TTT-3'
6F: 5'-ATT GTT GTG CCC CTA CCT G-3'	16F: 5'-GGC CTT CTC CTT TAC CCC TCC TT-3'
6R: 5'-CCC CAG ACA GGC AAT AGG TA-3'	16R: 5'-CAG CCA TTT GCC TCA CGA ACA C-3'
7F: 5'-AAT CTC TAC CCT CAG GCC AT-3'	17F: 5'-CAC TGG TCC TTT CAC TCT CT-3'
7R: 5'-ACC CTC CCT CCC TGG AG-3'	17R: 5'-GGG AGG GAA TGC ACA CAG AT-3'
8F: 5'-TGG TGC TGT TCC CTG TCC-3'	18F: 5'-GGC TGT CCT TCT GAG ACC TG-3'
8R: 5'-CCA CCG GTG CCA TCG CCC CT-3'	18R: 5'-AAG TGC CCT GGG GTG AGG CT-3'
9F: 5'-GGA GGT GGT GGG GGC GTG TG-3'	19F: 5'-TAG TTG TGG CAC ATG GCT TG-3'
9R: 5'-AAG CTG AAG TGC CTG TGG GAT C-3'	19R: 5'-GAG AGG AAG GAT AGT GCA GA-3'
10F: 5'-GGG CCT ATG CTT GCG ACA CCA-3'	20F: 5'-AAA GGG AGT TTT GCC AAG GCC-3'
10R: 5'-CCA GAG GGA GGG AGG GAA GTT T-3'	20R: 5'-CAA AGA AAG GGC CGG TAG AC-3'
11F: 5'-GGT CTA GGA GGG GGC AGT AAA TGG-3'	21F: 5'-CCG GGC CCA CCA CAT CAT C-3'
11R: 5'-CAG CGT TGG CAG CCC CTC ACA G-3'	21R: 5'-AGC CCA AAT TAG AGC CAG GTT ACG-3'

Kontrolní elektroforézou na agarózovém gelu se ověří, zda se všechny fragmenty naamplifikovaly a zda není kontaminována kontrola bez DNA – non template control (NTC). Amplifikované vzorky jsou prokázány vlivem interkalačního barviva (GelRed 10000x in Water, Biotium) rozpuštěného v 1,5% agarózovém gelu, které se vmezeřuje mezi vlákna DNA a je viditelné pod UV světlem v podobě proužků. U vzorků, kde k namnožení fragmentu nedošlo, se žádné proužky nezobrazí.

PCR produkty se purifikují s využitím technologie Agencourt založené na bázi paramagnetických částic (Ampure XP). Na tyto částice se selektivně navážou amplikony a umístěním zkumavky se vzorkem na magnetický stojánek se částice s navázanou DNA lokalizují na stěnu zkumavky. Promývacím postupem za použití 70% ethanolu se odstraní

nadbytečné primery, nukleotidy, soli a enzymy. DNA je z paramagnetických částic uvolněna sterilní vodou a za pomoci magnetického stojánu je čistý roztok přenesen do nové zkumavky. Purifikované PCR produkty jsou poté připraveny k sekvenační reakci.

K sekvenační reakci (Tab. 8, 9) je užíván DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter). Jedná se také o PCR, již se kromě nukleotidů účastní i menší část fluorescentně značených dideoxynukleotidů, které při zařazení do řetězce syntézu nového vlákna ukončí. Vznikne tak směs fragmentů DNA o různé délce primer + 1 až x nukleotidů, která se opět purifikuje pomocí paramagnetických částic CleanSEQ (Agencourt), které jsou použitelné i pro krátké fragmenty DNA.

**Tab. 8** Protokol sekvenační reakce (30 cyklů – 96°C 20 s, 50°C 20 s, 60°C 4 min)

Sekvenační primer (F/R)	1,6 µl
Purifikované PCR produkty	4,4 µl
Quick Start Master Mix	4,0 µl

**Tab. 9** Sekvence primerů na sekvenaci exonů *RET* proto-onkogenu

Primery na sekvenaci (2. – 11. exon)	Primery na sekvenaci (12. – 21. exon)
2F: 5'-AGT GGC ATT GGG CCT CTA C-3'	12F: 5'-TCT TCT CCC CTT CCC TCA T-3'
2R: 5'-TGC GGA CAC TGA GCT TCT C-3'	12R: 5'-CCC CGG AGA CTC CCC CAG-3'
3F: 5'-ACC GCG GCT TTC CCC TGC T-3'	13F: 5'-AGA AGC CTC AAG CAG CAT CGT C-3'
3R: 5'-CTC CAG GAG CCT GTA GGC-3'	13R: 5'-AGG AGC AGT AGG GAA AGG GAG AAA-3'
4F: 5'-CGA GGA AAG CGG CTG GCC CG-3'	14F: 5'-CTG TGT CCA CCC CCT TAC TCA TTG-3'
4R: 5'-AAC GAG AAA CGA ACT GTG GCC G-3'	14R: 5'-GAG TGT GGC ATG GTG GGG GAG TGG-3'
5F: 5'-GAC ACC GTG GTG GCC ACG C-3'	15F: 5'-GTC TCA CCA GGC CGC TAC CC-3'
5R: 5'-TAT AGT CAT GTA CGG TCG C-3'	15R: 5'-GCT CCA CTA ATC TTC GGT ATC TTT-3'
6F: 5'-ATT GTT GTG CCC CTA CCT G-3'	16F: 5'-GGC CTT CTC CTT TAC CCC TCC TT-3'
6R: 5'-CCC CAG ACA GGC AAT AGG TA-3'	16R: 5'-CAT GTA TAA GGG TGT TTC TG-3'
7F: 5'-AAT CTC TAC CCT CAG GCC AT-3'	17F: 5'-CAC TGG TCC TTT CAC TCT CT-3'
7R: 5'-ACC CTC CCT CCC TGG AG-3'	17R: 5'-GGG AGG GAA TGC ACA CAG AT-3'
8F: 5'-TGG TGC TGT TCC CTG TCC-3'	18F: 5'-GGC TGT CCT TCT GAG ACC TG-3'
8R: 5'-CCA CCG GTG CCA TCG CCC CT-3'	18R: 5'-AAG TGC CCT GGG GTG AGG CT-3'
9F: 5'-GGA GGT GGT GGG GGC GTG TG-3'	19F: 5'-TAG TTG TGG CAC ATG GCT TG-3'
9R: 5'-AAG CTG AAG TGC CTG TGG GAT C-3'	19R: 5'-GAG AGG AAG GAT AGT GCA GA-3'
10F: 5'-GGA CAC TGC CCT GGA AAT A-3'	20F: 5'-AAA GGG AGT TTT GCC AAG GCC-3'
10R: 5'-CCT TGT TGG GAC CTC AGA TGT G-3'	20R: 5'-CAA AGA AAG GGC CGG TAG AC-3'
11F: 5'-GGT CTA GGA GGG GGC AGT AAA TGG-3'	21F: 5'-CCG GGC CCA CCA CAT CAT C-3'
11R: 5'-CAG CGT TGG CAG CCC CTC ACA G-3'	21R: 5'-AGC CCA AAT TAG AGC CAG GTT ACG-3'

Při vlastní analýze na kapilárním sekvenátoru CEQ 8000 (Beckman Coulter) se fragmenty DNA dle jejich délky separují v polyakrylamidovém gelu protékajícím kapilárami a analyzátozem je snímáno pořadí značených dideoxynukleotidů, které udává sekvenci daného úseku DNA. Sekvence jednotlivých fragmentů DNA je porovnávána s referenční sekvencí (NM\_020975.4, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5979>) a vyhodnocena.

### 3.2.3 Sekvenování nové generace

Pro detekci alterací v *RET* proto-onkogenu byla rovněž zavedena metoda sekvenování nové generace. Sekvenovány jsou buď klasicky připravené amplikony zahrnující jednotlivé exony nebo dlouhé řetězce pokrývající celý *RET* proto-onkogen (Tab. 10), které jsou připraveny pomocí Long Range PCR (Qiagen). Sekvence probíhá na přístroji MiSeq (Illumina) s využitím kitu na přípravu genomové knihovny Nextera (Illumina). Princip spočívá nejprve v tagmentaci produktů PCR, kdy je DNA pomocí transpozómů fragmentována na úseky dlouhé přibližně 300 bp, na jejichž konce jsou navázány specifické sekvence adaptorů. Následně jsou během amplifikace k fragmentům připojeny tzv. indexy, které charakterizují konkrétní vzorek, a také sekvence komplementární k sekvencím oligonukleotidů uchyceným na flow cell, na které pak v sekvenátoru probíhá vlastní sekvenační reakce. Na tuto flow cell jsou v přístroji nařaděné DNA knihovny dávkovány a klonální amplifikací jsou vytvořeny klastry, identické kopie jednotlivých molekul DNA. Antikódující vlákna jsou po denuraci uvolněna a odmyta a na kódujících vláknech dochází k tzv. sekvenaci syntézou, při níž je zaznamenávána intenzita uvolněné fluorescence specifické pro jednotlivé dideoxy-nukleotidy s fluorofory po excitaci LED. Bioinformatická analýza převede zaznamenané záblesky fluorescence (TIFF, JPEG soubory) na textové soubory s pořadím nukleotidů v jednotlivých klastrech a s informacemi o kvalitě stanovení každé baze (FASTQ soubory). Sekvence jsou různými algoritmy filtrovány dle kvality, seskládány a porovnány s referenční sekvencí (hg19). BAM soubory (zarovnané sekvence) je možné graficky zobrazit a vyhodnotit např. v programu Integrative Genomics Viewer (Broad Institute), stejně jako VCF soubory (odlišnosti

od referenční sekvence), pro jejichž vyhodnocení je navíc využíván program Variant studio (Illumina), který zachycené varianty porovná s databázemi.

**Tab. 10** Sekvence primerů pro Long Range amplifikaci úseků *RET* proto-onkogenu

Označení primeru (gen, část)	Lokalizace fragmentu	Sekvence primerů (5'-3')	Délka fragmentu (bp)
Hs_RET_01a_LR	5'UTR – Intron 1	F: 5'-GGTTGTAGTTGAGAAGCCCAAGGAGAAGTTGTAAA-3' R: 5'-CTCCCCATTTGACCTCATAGTCCCACTGA-3'	10 179
Hs_RET_02a_LR	Intron 1	F: 5'-TGCAGAGGCACTTCCTTCCACTTCAG-3' R: 5'-CGTCCTGCTCTCTCCTAAATTCCTGTGT-3'	9 158
Hs_RET_03a_LR	Intron 1	F: 5'-GGGCACTGTCTGTCAGCCTCATACTCTTG-3' R: 5'-CCTGGTCCACATACAGCTTCTCCAGTAA-3'	10 699
Hs_RET_04a_LR	Intron 1 – Intron 6	F: 5'-GGGTGACCTGTTGAGAAGTCTGTATGGTTCA-3' R: 5'-GCAGCTGAATTTTCAACCTCTTGGCAAC-3'	10 360
Hs_RET_05a_LR	Intron 6 – Intron 15	F: 5'-CGTGGTGTCTTTCTGGGATGTTTCTCGTAAG-3' R: 5'-GCCCACTGCCTGTTTCATAGACTTGGACAA-3'	10 881
Hs_RET_06a_LR	Exon 15 – Intron 20	F: 5'-TCGGATTTTCGGCTTGTCCCGAGATGTTTA-3' R: 5'-CGTGTCCAATAAGCATTTTTCAAACCTCTCC-3'	9 685
Hs_RET_07a_LR	Intron 20 – 3'UTR	F: 5'-AGCCACTACCCCTGATGAGAACAGTATGAAG-3' R: 5'-TGAGCCCTCCACGACAGAGCATCTTTAC-3'	9 911

### 3.2.4 Genotypizace polymorfismů pomocí TaqMan sond

Pro genotypizaci polymorfismů *RET* proto-onkogenu byly navrženy TaqMan sondy (Applied Biosystems). Analýza byla provedena pomocí metody real-time PCR na přístroji Light Cycler 480 (Roche). Amplifikace probíhaly za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95 °C 10 min, následovalo 50 cyklů (92 °C 15 s, 60 °C 1 min) a pro větší rozlišení jednotlivých genotypů byla provedena barevná kompenzace (95 °C 10 s, 50 °C 30 s a 70 °C dále). Při analýze byly vždy použity negativní kontroly a předem známé kontrolní vzorky pro heterozygotní variantu a obě homozygotní varianty konkrétního polymorfismu (Tab. 11).

**Tab. 11** Protokol genotypizační analýzy pomocí TaqMan Assay

Reagencie	Množství [μl]
DNA	1,5
Mastermix:	4,0
40x TaqMan Assay (Applied Biosystems)	0,14
Sterilní H <sub>2</sub> O	1,11
2x TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems)	2,75
Celkem	5,5

### 3.3 *In silico* analýza

Nově nalezené mutace či varianty neznámého významu byly otestovány *in silico* pomocí veřejně dostupných programů používajících různé algoritmy:

**PolyPhen-2** (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) dokáže predikovat potenciální dopad záměny aminokyseliny nebo nukleotidu na strukturu a funkci lidského proteinu tím, že porovnává fyzikálně-chemické rozdíly mezi proteinem se substitucí aminokyseliny a wild-typem. Záměnu aminokyseliny klasifikuje vzestupně od „benigní“ přes „možná patogenní“ (menší jistota predikce) k „pravděpodobně patogenní“ (větší jistota predikce).

**SIFT** (<http://sift.jcvi.org/>) předpovídá, zda záměna aminokyseliny ovlivní funkci proteinu. Predikce je založena na stupni konzervace dané aminokyseliny u proteinových homologů napříč několika živočišnými druhy. V klasifikaci je záměna aminokyseliny v proteinu tolerována (a neovlivňuje funkci proteinu) či netolerována (a ovlivňuje funkci proteinu).

**Align-GVGD** (<http://agvgd.iarc.fr/>) predikuje, v jakém místě genu jsou záměny aminokyselin patogenní na základě kombinace dvou proměnných GV (Grantham Variation) a GD (Grantham Deviation) a biofyzikálních vlastností aminokyselin. GV určuje rozsah variability pro pozici aminokyseliny v sekvenci u proteinových homologů napříč živočišnými druhy, GD posuzuje záměnu aminokyseliny v této pozici ve vztahu k GV. Výstupem je klasifikace posuzované záměny ve stupnici od mutace „s nejmenší pravděpodobností patogenní“ (C0) po mutaci „s největší pravděpodobností patogenní“ (C65).

### 3.4 Statistická analýza

Frekvence polymorfismů byly statisticky zhodnoceny a porovnány mezi studovanými soubory pomocí chí-kvadrát testu a programu NCSS 2004. Výsledky analýzy byly považovány za statisticky významné, pokud hladina významnosti statistického testu (p-hodnota) byla nižší než 0,05. Relativní riziko bylo určeno jako odds ratio (OR) s 95% konfidenčním intervalem (CI).

Analýza vazby mezi polymorfismy byla provedena za pomoci programu Haploview (verze 4.1), který dokáže identifikovat haplobloky zahrnující polymorfismy v silné vazebné nerovnováze. Tento program také generuje haplotypy, tj. nejpravděpodobnější kombinace polymorfismů na rodičovských chromozomech, a vyhodnocuje distribuční rozdíly mezi studovanými skupinami. Následně byl využit program PHASE (verze 2.1), který na základě zadaných genotypových dat jednotlivých polymorfismů generuje haplotypy a diplotypy (dvojice haplotypů z každé alely) u každého studovaného jedince.

## 4. Výsledky, komentáře a diskuze

V této části disertační práce jsou dokumentovány a diskutovány výsledky publikovaných prací vztahujících se k anotovaným cílům, u kterých jsem hlavním autorem či spoluautorem.

### 4.1 Detekce zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu u pacientů s MTC

#### 4.1.1 Výsledky

Výsledky vyšetření zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu u pacientů s MTC jsou shrnuty v Tab. 12, 13. V Tab. 14 jsou uvedena klinicko-patologická data pacientů s MEN 2B. Záchyt mutací a korelace genotypu *RET* proto-onkogenu s fenotypovými projevy onemocnění jsou podrobněji rozebrány v diskuzi a komentáři k přiloženým publikacím (Příloha č. 7–11), které se detekci zárodečných mutací u českých pacientů s MTC věnují.

**Tab. 12** Záchyt zárodečných mutací *RET* proto-onkogenu u českých pacientů s MTC a výsledky genetické analýzy u rodinných příslušníků (celkem testováno 871 osob)

	Sporadický MTC	FMTC	MEN2A	MEN2B	Celkem
Počet testovaných rodin s MTC	451	16	14	9	490
Záchyt zárodečné mutace	27	11	13	9	60
<b>Procentuální záchyt</b>	<b>6 %</b>	<b>69 %</b>	<b>93 %</b>	<b>100 %</b>	
<b>Počet index pacientů s MTC</b>	451	16	14	9	<b>490</b>
Záchyt zárodečné mutace	27	11	13	9	60
Neinformativní výsledek	424	5	1	0	430
<b>Počet rodinných příslušníků</b>	215	74	72	20	<b>381</b>
Záchyt zárodečné mutace	17	26	27	3	73
Negativní výsledek	27	26	44	17	114
Neinformativní výsledek	171	22	1	0	194

*Index pacient* – základní pacient, který byl jako první z rodiny poslán na genetické vyšetření. *Neinformativní výsledek* - nenalezena zárodečná mutace v šesti vyšetřovaných rizikových exonech *RET* proto-onkogenu. *Negativní výsledek* - nenalezena zárodečná mutace *RET* proto-onkogenu, která byla cíleně vyšetřována vzhledem k jejímu záchytu v rodině

**Tab. 13** Zárodečné mutace v *RET* proto-onkogenu detekované v českých rodinách s MTC

Exon	Mutace	Záměna nukleotidu	Sporadický MTC	FMTC	MEN2A	MEN2B
			n=451	n=16	n=14	n=9
5	Gly321Arg	GGG/AGG	-	1	-	-
10	Cys609Tyr	TGC/TAC	-	1	-	-
	Cys611Arg	TGC/CGC	1	-	-	-
	Cys611Tyr	TGC/TAC	2	1	-	-
	Cys618Arg	TGC/CGC	-	2	-	-
	Cys620Arg	TGC/CGC	-	-	1	-
	Cys620Phe	TGC/TTC	-	-	1	-
11	Cys634Arg	TGC/CGC	1	-	8	-
	Cys634Tyr	TGC/TAC	1	-	1	-
	Cys634Ser	TGC/AGC	-	1	1	-
	Cys634Ser	TGC/TCC	-	-	1	-
	Cys634Trp	TGC/TGG	-	1	-	-
	Cys634Phe	TGC/TTC	1	-	-	-
	Ser649Leu	TCG/TTG	3	-	-	-
13	Glu768Asp	GAG/GAC	-	1	-	-
	Leu790Phe	TTG/TTT	3	-	-	-
	Tyr791Phe	TAT/TTT	3	2	1	1
14	Val804Leu	GTG/TTG	3	-	-	-
	Val804Met	GTG/ATG	8	1	-	-
15	Ser891Ser	TCG/TCA	1	-	-	-
16	Met918Thr	ATG/ACG	-	-	-	9

**Tab. 14** Pacienti s MEN 2B se zárodečnou mutací Met918Thr v 16. exonu *RET* proto-onkogenu

Pacient	Pohlaví	Věk dg MTC	TNM	Věk feo	Pozn.
<b>A1</b>	M	31	T4N2M1pp	41	zemřel v 51 letech
<b>B1</b>	Ž	14	T2N0M0	31	zemřela v 33 letech
B2	M	7	T1N0M0	-	matka s MEN 2B
B3	M	4	T1N0M0	-	matka s MEN 2B
<b>C1</b>	Ž	25	T3N2M1h	29	mutace de novo
<b>D1</b>	Ž	16	T2N2M0	21	mutace de novo
<b>E1</b>	Ž	15	T1N1M0	-	mutace de novo
<b>F1</b>	Ž	14	T2N0M0	-	mutace de novo
<b>G1</b>	Ž	11	T2N1M0	-	mutace de novo
<b>H1</b>	M	25	T2N2M0	-	mutace de novo
<b>I1</b>	M	6*	CCH	-	matka s MEN 2B

\*pacient s profylaktickou TTE na základě genetického screeningu; pp – plíce; h - játra



**Příloha č. 7:** Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Ryska A, Cap J, Vlcek P, Duskova J, Kodetova D, Holub V, Novak Z, Bendlova B. Double Germline Mutations in the *RET* Proto-oncogene in MEN 2A and MEN 2B Kindreds. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2006; 114(4): 192-196. (IF – 1,760)

**Příloha č. 8:** Holub V, Dvořáková S, **Václavíková E**, Ryška A, Čáp J, Vlček P, Dušková J, Kodetová D, Novák Z, Bendlová B. Význam molekulárně genetického vyšetření u syndromu mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2A na příkladu jedné rodiny o třech generacích. *Prakt lék* 2007; 87(3): 157-159.

**Příloha č. 9:** Maruna P, Duskova J, Limanova Z, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Bendlova B. Mixed medullary and follicular cell carcinoma of the thyroid in a 71-year-old man with history of malignant melanoma. *Med Sci Monit* 2008; 14(4): CS31-36. (IF – 1,216)

**Příloha č. 10:** Ryska A, Cap J, **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Bendlova B, Hovorkova E, Kohout A. Paraganglioma-like medullary thyroid carcinoma: fine needle aspiration cytology features with histological correlation. *Cytopathology* 2009; 20(3): 188-194. (IF – 1,470)

**Příloha č. 11:** **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, Dvorakova K, Vlcek P, Skaba R, Zelinka T, Bendlova B. *RET* mutation - Tyr791Phe - the genetic cause of different diseases derived from neural crest. *Endocrine* 2009; 36(3): 419-424. (IF – 3,527)

#### 4.1.2 Diskuze a komentář k přílohám č. 7–11

##### 4.1.2.1 Záchyt zárodečných mutací v českých rodinách s MTC

Vyšetření zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu u pacienta s MTC představuje sekvenační analýzu rizikových exonů (10., 11., 13., 14., 15. a 16. exon). V těchto exonech bylo dle odborné literatury zachyceno 98 % zárodečných mutací v souvislosti s fenotypem MTC (Raue et al. 2012). Od r. 2014 byla u českých pacientů genetická analýza rozšířena také o 8. exon, jehož mutace byly v několika rodinách s FMTC popsány jako kauzální (Da Silva et al. 2003, Peppas et al. 2008, Castro et al. 2013). Jestliže je u pacienta detekována zárodečná mutace, je zhodnocena její agresivita dle klasifikace rizika jednotlivých mutací (Tab. 3) a predikován další průběh onemocnění. V některých případech je diagnóza potvrzena až na základě molekulárně genetického vyšetření. Posléze je rodinným příslušníkům pacienta, kteří jsou v riziku onemocnění, nabídnuto cílené genetické vyšetření zjištěné mutace. Při pozitivním záchytu je indikována profylaktická TTE a screening feochromocytomu a primární hyperparathyreózy. Doporučení ohledně věku TTE a screeningu jsou závislá na typu konkrétní mutace (Kloos et al. 2009). Naopak negativní výsledek znamená, že testovaný příbuzný pacienta nemá riziko vzniku onemocnění vyšší oproti normální populaci a může být z pravidelného screeningu MTC, feochromocytomu a hyperparathyreózy vyloučen.

Z celkového počtu 490 testovaných pacientů a 381 rodinných příslušníků byla zárodečná mutace nalezena u 60 pacientů a 73 jejich členů rodin (Tab. 12, 13).

Všichni pacienti s MEN 2B (100 %) byli nositeli mutace Met918Thr v 16. exonu. U šesti pacientů s MEN 2B jsme potvrdili mutaci *de novo*, když u rodičů pacienta nebyla mutace Met918Thr detekována. Ve dvou rodinách byla mutace přenesena z matky na potomky. V první rodině (Příloha č. 7) pacientka s MEN 2B předala dvojitou mutaci Met918Thr a Tyr791Phe dvěma synům (dnes 23 a 18 let), kteří již od narození měli fenotypické symptomy MEN 2B (fibropapilomy na jazyku, marfanoidní habitus). Od 3 let byla u nich sledována hladina kalcitoninu stimulovaná kalcie a pentagastrinem. U staršího syna došlo k vzestupu kalcitoninu v 7 letech, mladší syn měl zvýšené hladiny kalcitoninu již ve 3 letech. Po výkonu TTE (u mladšího syna až ve 4 letech po opakovaném pozitivním

testu) byl histologicky prokázán nález MTC (T1N0M0) a oboustranné CCH u obou pacientů. Ve 12 letech se u obou chlapců hladina kalcitoninu opět zvýšila a oba podstoupili exstirpaci lymfatických uzlin pro recidivu MTC. Ve druhé rodině byla provedena TTE u syna pacientky s MEN 2B ve věku 6 let na základě pozitivního genetického vyšetření s histologickým nálezem CCH. V odborné literatuře je ve spojitosti s mutací Met918Thr uveden věk nejmladšího pacienta s MTC 9 měsíců (de Groot et al. 2006). Dle mezinárodních doporučení se proto navrhuje vyšetřit hladiny kalcitoninu a provést ultrasonografické i genetické vyšetření již během prvních 6 měsíců života. V případě pozitivního genetického výsledku je indikována profylaktická TTE s centrální disekcí lymfatických uzlin před dovršením věku 1 roku. Předpokládá se, že pouze co nejčasnější profylaxí lze zamezit rozvoji nádorového onemocnění, které je navzdory provedené TTE demonstrováno na předchozích dvou příkladech, kde se s odstraněním štítné žlázy čekalo až na pozitivní kalcitoninový test. Je nutné však zmínit vysokou obtížnost chirurgického výkonu a hlavně náročnost substituce hormonů štítné žlázy u pacientů v takto nízkém věku.

U pacientů s MEN 2A byla nejčastěji (79 %) detekována zárodečná mutace v 11. exonu v kodónu 634, kde byl cystein nahrazen jinou aminokyselinou, zpravidla argininem, tyrosinem a serinem, ale u dvou rodin také fenylalaninem a tryptofanem. Častý záchyt této mutace u českých rodin s MEN 2A odpovídá světovým datům, s čímž souvisí i vysoké riziko feochromocytomu a primární hyperparathyreózy. Přesto tato mutace byla zaznamenána také v rodinách s FMTC, kde MTC není asociován s dalšími fenotypovými projevy. Do další kategorie agresivních mutací, asociovaných s MEN 2A i FMTC, spadají mutace zachycené v 10. exonu v cysteinových kodónech 609, 611, 618 a 620, které byly v českých rodinách rovněž hojně detekovány. Rodiny s FMTC, které mají mírnější klinické projevy onemocnění a především pozdní věk diagnózy, mají mutaci potvrzenou ve 13. a 14. exonu. Velmi častá mutace je Val804Met ve 14. exonu. Pravděpodobně z důvodu mírnějších klinicko-genetických kritérií pro zařazení do rodin s FMTC je náš detekční záchyt mutací v *RET* proto-onkogenu u FMTC nižší (69 %) než udávají světové studie, i když jsme screenovali celý gen. Geneticky nedořešené rodiny jsou pro nás velkou výzvou, protože v souvislosti s FMTC jiný gen než *RET* není dle literatury asociován. Také jsme potvrdili, že je velice prospěšné geneticky vyšetřovat i všechny sporadické případy MTC.

Záchyt zárodečné mutace byl 6 % a vyloučil tak předpokládaný sporadický výskyt u těchto pacientů. Zároveň však tito pacienti a jejich rodiny nesplňují přísnou podmínku zařazení do kategorie rodin s FMTC, přestože mnohé z nich mají zárodečnou mutaci potvrzenou i u dalších, ale zatím zdravých rodinných příslušníků. U řady pacientů vzhledem k jejich vyššímu věku již nelze zjistit, zda se jedná o mutace *de novo* nebo se již u rodiče pacienta nacházely. V našem souboru tedy zůstávají zařazení jako „zdánlivě“ sporadické případy.

#### **4.1.2.2 Korelace genotypu *RET* proto-onkogenu s fenotypovými projevy**

Sledování a vyhodnocení vztahu mezi nalezenými mutacemi v *RET* proto-onkogenu a jejich fenotypovými projevy je nezbytné pro zhodnocení rizika onemocnění, možnost predikce jeho průběhu a genetické poradenství rodinám s detekovanou mutací.

V **Příloze č. 8–10** je popsáno několik zajímavých kazuistik (smíšený medulární a folikulární karcinom štítné žlázy u pacienta s historií maligního melanomu; dva velmi vzácné případy „paraganglioma-like“ MTC s detekcí zárodečné/somatické mutace Met918Thr; rodina s MEN 2A se zárodečnou mutací Cys634Arg).

V souladu se světovými studii bylo v našem souboru pozorováno, že mutace Met918Thr v 16. exonu představuje nejvyšší riziko a manifestaci MTC v rozmezí věku 4-31 let, při čemž vysoké hladiny stimulovaného kalcitoninu ukazující na aktivitu onemocnění byly zaznamenány již u 3letého chlapce (Tab. 14). Mutace v 10. a 11. exonu korelovaly s věkem diagnózy mezi 20. - 40. rokem, zatímco mutace ve 13. a 14. exonu se projevovaly jako velice variabilní ve věku onemocnění (50 - 80 let).

#### **4.1.2.3 Mutace Tyr791Phe ve 13. exonu *RET* proto-onkogenu**

Překvapivě vysoký byl výskyt mutace Tyr791Phe ve 13. exonu *RET* proto-onkogenu, která byla zaznamenána u všech námi studovaných souborů pacientů s neurokristopatiemi, tj. onemocněními odvozenými od neutrální lišty. Mutace se zvláště během posledních pěti let stala velice diskutovanou a rozporuplnou a také naše pracoviště přispělo k hodnocení

jejího výskytu a klinického impaktu. Náš screening zahrnul 490 rodin s MTC, 214 pacientů s HSCR a 97 pacientů s feochromocytomem. Mutace byla detekována u 3 pacientů se zdánlivě sporadickým MTC, u 4 rodin s familiární formou MTC (MEN 2/FMTC), 9 rodin s HSCR a 1 pacienta se vzácnou maligní formou feochromocytomu. Všichni nositelé mutace byli též nositeli polymorfismu Leu769Leu ve 13. exonu. U 3 rodin byla nalezena i druhá zárodečná mutace (Příloha č. 7) na stejné alele (v cis pozici): u rodiny s MEN 2B mutace Met918Thr v 16. exonu, u rodiny s MEN 2A mutace Cys620Phe v 10. exonu a u pacienta s HSCR mutace Ser649Leu v 11. exonu. I když se může zdát, že dvojitě mutace by měly mít větší klinický dopad na projev onemocnění, u našich dvou rodin s MEN 2 nebyl potvrzen rozdíl oproti rodinám s jednoduchými mutacemi. Vypadá to, že agresivnější mutace, tedy mutace v 10. a 16. exonu, určuje charakter nemoci. Vysoký záchyt mutace u rodin s HSCR nabízí otázku, zda tato mutace má také duální charakter, tedy zda může být zároveň i inaktivující, podobně jako „Janusovy“ mutace v cysteinových kodónech 10. exonu *RET* proto-onkogenu u pacientů s HSCR.

Mutace Tyr791Phe byla prvně publikována jako *de novo* právě u pacienta s HSCR (Seri et al. 1997). O rok později byla popsána jako jedna z kauzálních zárodečných mutací pro vznik MTC (Berndt et al. 1998), což vedlo k podrobnějšímu zkoumání jejího vlivu a bylo provedeno několik funkčních studií. Bylo zjištěno, že vlivem mutace dochází ke změně terciární struktury katalytické domény, čímž je protein více přístupný k substrátu a konformaci potřebné pro vazbu ATP. Mutace způsobí autofosforylaci a aktivaci receptoru RET i nezávisle na ligandu GDNF a mutantní RET protein je více exprimován v plazmatické membráně (Plaza-Menacho et al. 2005). Byly také pozorovány zvýšené proliferací vlastnosti, podpořené tvořením kolonií a nádorovým růstem, a zvýšená rezistence k apoptóze v *in vitro* studiích (Mise et al. 2006). Funkční studie ve spojení s HSCR patrně nebyla provedena.

Mutace byla proto dlouhou dobu jednoznačně považována za aktivující mutaci způsobující FMTC. Byla vydána mezinárodní doporučení, jak postupovat při detekci této mutace u nositelů (Brandi et al. 2001, de Groot et al. 2006, Kloos et al. 2009). Zařazena byla do skupiny nejméně agresivních mutací s rizikem vzniku MTC, které se vyznačují nízkou penetrancí, fenotypickou heterogenitou a variabilitou věku onemocnění, a u nichž

se profylaktická TTE provádí mezi 5. a 10. rokem věku. Dle tohoto doporučení byli i nositelé v našich rodinách indikováni k TTE, konečné rozhodnutí je ale vždy na pacientech. U rodiny s MEN 2A a s MEN 2B byl fenotyp onemocnění ovlivněn především agresivnějšími mutacemi v 10. a 16. exonu, na základě jejichž detekce je indikace TTE nesporná. U rodin s FMTC, sporadickou formou MTC a feochromocytomem podstoupilo TTE 6 nositelů mutace, u 5 z nich byla zaznamenána CCH, a 9 členů rodin s detekovanou mutací operaci odmítlo či ještě nepodstoupilo. Pacientům s HSCR a jejich zdravým příbuzným, kteří byli nositeli mutace, se rovněž dalo na zvážení, zda přistoupí k profylaktické TTE či zvolí méně radikální postup a budou pouze dispenzarizováni na endokrinologii. Profylaktickou TTE ne zvolil vzhledem k její nižší agresivitě a u pacientů s HSCR vzhledem k jejich nízkému věku ani jeden.

Později se však objevila studie (Erlic et al. 2010), která popisuje tuto variantu jako polymorfismus či variantu nejasného významu a své tvrzení dokládá několika důkazy. Vychází ze svých zjištění, kdy záchyt této varianty v souboru pacientů s feochromocytomem a/nebo paragangliomem porovnávala s kontrolní skupinou, kterou tvořilo 1000 zdravých jedinců. Nositeli této varianty bylo 13 vyšetřených pacientů z 1475 (0,9 %) a 8 osob z 1000 kontrol (0,8 %). Výskyt mutace byl tedy srovnatelný v obou skupinách. Byla přezkoumána klinická data a rodinná anamnéza pacientů, přičemž nebyly zjištěny žádné symptomy ukazující v rodinách na MEN 2. U nositelů, kteří podstoupili profylaktickou TTE, nebyl v odoperované tkáni štítné žlázy nalezen MTC. Pouze jeden pacient měl histologicky potvrzenou hyperplazii C buněk (CCH). CCH může ale, jak se ve studii uvádí, souviset i s jinými onemocněními štítné žlázy nebo se nacházet ve zdravé populaci. U tohoto pacienta byla CCH monofokální a u MEN 2 pacientů bývá CCH multifokální a monoklonální. S těmito závěry byla varianta Ty791Phe prohlášena v souvislosti s MEN 2 za nepatogenní, i když autoři nevylučují její možnou modifikující funkci ve vazbě na některou vysoce penetrantní patogenní mutaci. Studie byla však provedena u pacientů s feochromocytomem a ne u pacientů s MTC či HSCR. Screening u našich zdravých kontrol zaznamenal tuto mutaci u jednoho jedince, přičemž bylo později zjištěno, že se tato osoba začala léčit se štítnou žlázou a byla tímto z kontrolního souboru vyřazena. Je ale pravda, že soubor našich kontrol byl méně početný (205 jedinců) než ve zmíněné německé studii. Nejnovější brazilská studie (Toledo et al. 2015)

shromáždila sekvenční data 3000 brazilských zdravých kontrol a dalších 8000 jedinců bez nádorového onemocnění z jiných laboratoří a veřejných databází a došla k závěru, že frekvence Tyr791Phe v souboru zdravých kontrol je charakteristická pro vzácné benigní varianty a sama o sobě nezvyšuje riziko pro vznik MTC.

Vzhledem k tomu, o jak závažné důsledky se v případě špatné interpretace této varianty jedná, jsou nutné další důkazy a širší studie na velkém souboru zdravých jedinců, ke kterým budou dostupná podrobná klinická a anamnestická data, aby bylo zjištěno, zda tato varianta hraje roli v patogenezi MTC či HSCR. Způsobem, jak interpretovat nález této mutace, se zabývala i evropská organizace The European Molecular Genetics Quality Network (EMQN), která každoročně pořádá externí kontrolu kvality pro genetické vyšetření syndromu MEN 2, jíž se naše oddělení již od jejího pilotního schématu v roce 2008 účastní. S úmyslem ujednotit doporučení ohledně nálezu varianty Tyr791Phe byl v roce 2013 mezi rozeslané kontrolní vzorky zařazen i vzorek s touto variantou. Z usnesení EMQN vyplývá, že každá laboratoř může zaujmout vlastní stanovisko, zda k této variantě bude přistupovat nadále jako k patogenní mutaci či jako k variantě nezpůsobující MTC. Ve zprávě o výsledku genetického vyšetření je však její nespornou povinností uvést, že interpretace této varianty je kontroverzní, a laboratoř musí seznámit lékaře, který vyšetření požadoval, s oběma interpretacemi této varianty.

#### **4.1.3 Shrnutí**

Karcinomy štítné žlázy představují nejčastější onkologické onemocnění v endokrinologii. Identifikace jednotlivých genetických změn v *RET* proto-onkogenu je podstatná nejen kvůli včasnému terapeutickému zásahu u rizikových osob ještě v presymptomatickém stadiu onemocnění, ale může také u pacientů pomoci zpřesnit diagnózu a odhadnout prognózu onemocnění. V rámci genetického testování rodin bylo popsáno několik unikátních kazuistik. V případě mutace Tyr791Phe došlo k přirozenému vývoji ve výkladu účinku mutace na základě nově opublikovaných vědeckých zjištění a stejně tak i v doporučeních, jak tyto sporné varianty interpretovat. V obecném pojetí je bohužel také zřejmé, jak závažné a ireverzibilní mohou být dopady pro zdravé nositele, když se

detekovaná varianta nesprávně interpretuje. Současná praxe našeho pracoviště navrhuje přistupovat k mutaci nadále jako k patogenní, než budou k dispozici exaktnější zjištění ohledně její role v patogenezi MTC, ale radikální profylaktickou TTE již v souvislosti s touto mutací nedoporučuje. Tím spíše je však nutné důsledné a pravidelné ultrasonografické vyšetření štítné žlázy a biochemický screening na MEN 2 u nositelů této varianty.



## 4.2 Detekce somatických mutací v *RET* proto-onkogenu u pacientů s MTC

### 4.2.1 Výsledky

Z 90 pacientů se sporadickým MTC byla mutace v nádorové tkáni detekována u 40 z nich (44 %). Nejčastější somatickou mutací v *RET* proto-onkogenu nalezenou u pacientů se sporadickým MTC je Met918Thr v 16. exonu (65 %). Výjimku netvoří ani mutace v cysteinových kodónech v 10. a 11. exonu, ať už bodové (Cys618Ser, Cys620Ser, Cys630Arg, Cys634Trp), nebo delece několika kodónů - 628-632del (c.1882-1896del), 628-633del (c.1884-1898del), 632-633del (c.1894-1899del). Přehled zachycených mutací v nádorových tkáních pacientů se sporadickým MTC je uveden v tabulce [Tab. 15](#).

**Tab. 15** Somatické mutace detekované u českých pacientů se sporadickým MTC

Exon	Somatická mutace	Exon	Somatická mutace
10	Val591Ile	15	Leu881Pro
10	Cys618Ser	15	Ala883Phe
10	Cys620Ser	15	Ala883Ser
11	Cys630Arg	15	Glu884Lys
11	Cys634Trp	15	Arg908Lys
11	Ala639Gly	16	Gly911Asp
11	Ala641Arg	16	Met918Thr
11	628-632del (c.1882-1896del)	16	Ala919Val
11	628-633del (c.1884-1898del)	16	Glu921Lys
11	632-633del (c.1894-1899del)	16	Ser922Pro
14	Val804Met	16	Thr930Met

**Příloha č. 12:** Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, Novak Z, Bendlova B. New Multiple Somatic Mutations in the *RET* proto-oncogene Associated with a Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2006; 16(3): 311-316. (IF – 3,843)

**Příloha č. 13:** Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, Ryska A, Laco J, Cap J, Kodetova J, Kodet R, Krskova L, Vlcek P, Astl J, Vesely D, Bendlova B. Somatic mutations in the *RET* proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 284(1-2): 21-27. (IF – 4,241)

#### 4.2.2 Diskuze a komentář k přílohám č. 12–13

Somatické mutace v *RET* proto-onkogenu způsobují nepřetržitou aktivaci RET proteinu, která vede až ke vzniku a manifestaci MTC. Prevalence somatických mutací v *RET* proto-onkogenu je v našem souboru pacientů se sporadickým MTC srovnatelná (44 %) s jinými studii, kde se frekvence detekovaných mutací pohybuje mezi 40 % (Ciampi et al. 2013) a 65 % (Moura et al. 2009).

Variabilita záchytu somatických *RET* mutací není zcela vysvětlena, jednou z mnoha hypotéz jsou etnické či geografické rozdíly mezi studovanými soubory. Přesto i v rámci jednoho národa byly zaznamenány značné rozdíly mezi různými studii. Dalším aspektem může být odlišný primární materiál, ze kterého se DNA izoluje. Při analýze somatických mutací je vhodnější použít čerstvě zamraženou nádorovou tkáň než nádorovou tkáň uchovávanou v parafinových bločkách, ve kterých je DNA degradována vlivem formalinu a analýza tak nebývá vždy úspěšná (Oczko-Wojciechowska et al. 2015).

Také použití odlišných metod může mít vliv na záchyt somatických mutací. Donedávna byla většina vyšetření provedena pomocí klasického Sangerova sekvenování, které ale v některých případech nedokázalo zachytit somatickou mutaci v odoperované tkáni s malým zastoupením nádorových buněk. Proto se stalo velice prospěšným využití sekvenování nové generace, které dokáže odhalit mutaci i ve smíšeném vzorku nádorové a zdravé tkáně, kde mohou být nádorové buňky zastoupeny jen v malém procentu. Pomocí NGS jsme i my u pacientky se sporadickým MTC odhalili somatickou mutaci Met918Thr (ATG/ACG), která byla zachycena pouze v 7 % osekvenovaných fragmentů DNA. Předchozí výsledek vyšetření Sangerovo sekvenováním byl u této pacientky sice „podezřelý“ (na sekvenogramu byl zobrazen mírně snížený pík baze T oproti negativním vzorkům), leč v obou směrech sekvenace negativní (pík baze C nebyl zaznamenán).

Somatická mutace Met918Thr v 16. exonu *RET* proto-onkogenu je majoritní mutací u pacientů se sporadickým MTC. Methionin v kodónu 918 je vysoce konzervovaný a je lokalizován v katalytickém jádře tyrozinkinázové domény. Mutace v tomto místě způsobí snazší přístup substrátu do katalytického jádra a zvýšenou autofosforylaci tyrozinkinázové domény (Santoro et al. 1995). V našem souboru byla tato mutace detekována u 29 %

pacientů, což představuje 65 % všech zachycených somatických *RET* mutací. Uvedené frekvence jsou konzistentní s recentní studií spojující výsledky genetické analýzy somatických mutací u sporadického MTC ze čtyř italských center (Ciampi et al. 2013).

U dvou našich pacientů byly kromě mutace Met918Thr zaznamenány i další přídavné mutace. U prvního pacienta se jednalo o mutaci Gly911Asp a Glu921Lys rovněž v 16. exonu, druhý pacient měl navíc detekovanou mutaci Val591Ile v 10. exonu *RET* proto-onkogenu. Při porovnání klinických a biologických rysů tumoru u pacientů s jednou mutací a pacientů s násobnou mutací nebyly shledány žádné rozdíly. Násobné mutace se v *RET* proto-onkogenu vyskytují zřídka, protože jedna somatická mutace je zde dostatečná k rozvoji karcinogeneze a vzniku MTC (Marsh et al. 1996).

Další somatické mutace v *RET* proto-onkogenu jsou detekovány zejména v 10., 11. a 15. exonu, a to bodové mutace (často v cysteinových kodónech či kodónu 883) i delece (především v 11. exonu). V našem souboru byly tyto mutace odhaleny u 16 % vyšetřovaných tumorů, v dalších studiích se záchyt mutací pohyboval od 12 % do 30 % (Moura et al. 2009, Boichard et al. 2012, Ciampi et al. 2013, Oczko-Wojciechowska et al. 2015).

Při korelaci klinicko-patologických dat pacientů s nálezem somatické *RET* mutace byla v našem souboru zjištěna asociace s horším klinickým výstupem a větší velikostí nádoru. V jiné studii (Moura et al. 2009) byli geneticky vyšetřeni pacienti rozděleni do tří skupin dle detekované somatické mutace. První skupina pacientů s mutací v 15. exonu (kodón 882, 883) a 16. exonu (Met918Thr) měla na základě signifikantních klinicko-patologických charakteristik nejagresivnější chování sporadického MTC. Se středním rizikem agresivního nádoru ji následovala skupina pacientů bez somatické *RET* mutace a nejnižší riziko klinického výstupu představovala skupina pacientů se somatickou *RET* mutací v jiných exonech než 15. a 16.

Zatím není zcela známo, jaké genetické příčiny stojí za vznikem sporadického MTC u pacientů bez somatické *RET* mutace. Zčásti byla další příčina odhalena, když byl u MTC zjištěn výskyt somatických mutací také v *RAS* genech. Jen výjimečně je *RAS* mutace detekována u pacienta již se somatickou *RET* mutací (Moura et al. 2011). Záchyt *RAS*

mutací se pohybuje od 11 % do 43 % pacientů se sporadickým MTC, či také od 18% do 81% *RET* negativních pacientů se sporadickým MTC (Moura et al. 2011, Boichard et al. 2012, Ciampi et al. 2013). Především se jedná o mutace v genech *K-RAS* a *H-RAS*, u genu *N-RAS* je záchyt somatické mutace velice vzácný (Oczko-Wojciechowska et al. 2015).

#### **4.2.3 Shrnutí**

Vyšetření somatických mutací v nádorové tkáni přispívá především ke zlepšení diagnostiky sporadických MTC. Přestože je pravděpodobnost hereditární formy MTC u pacientů bez zárodečné mutace v rizikových exonech *RET* proto-onkogenu zanedbatelná, přítomnost minoritní mutace v jiném, rutinně nescreenovaném exonu není zcela vyloučena. Detekce somatické mutace pak může hereditární formu onemocnění vyvrátit. Významnou úlohu má znalost somatické mutace také při predikci vývoje onemocnění a také při terapii pomocí tyrozinkinázových inhibitorů, při které je znalost konkrétní mutace stěžejní pro výběr vhodného preparátu.

### 4.3 Studium polymorfismů v *RET* proto-onkogenu u pacientů s MTC

#### 4.3.1 Výsledky

Při studii vlivu polymorfismů v *RET* proto-onkogenu na vznik onemocnění a schopnosti jej modulovat byl porovnán soubor 341 pacientů se sporadickým MTC a kontrolní soubor 205 zdravých jedinců (Tab. 16). Frekvence variantních alel se signifikantně lišily pouze u dvou studovaných polymorfismů - IVS14-24G/A ( $p=0,002$ ) a rs2435355 ( $p=0,04$ ), kde minoritní alela byla signifikantně v menším zastoupení u pacientů než u kontrol (v pořadí, 16,3 % vs. 24,1 %, 19,7 % vs. 25,1 %).

**Tab. 16** Alelická distribuce *RET* variant u pacientů se sporadickým MTC a u kontrol

SNP (rs No)	Exon/ Intron	Záměna (cDNA)	Záměna (Protein)	MTC (n=341): Variantní alela (%)	Kontroly (n=205): Variantní alela (%)	p-value ( $\chi^2$ )	OR (95% CI)
rs1864410	Intron1	c.73+2846G/T	IVS1+2846G/T	168 (24,6)	113 (27,6)	0,31725	0,86 (0,65 – 1,13)
rs2435357	Intron1	c.73+9277C/T	IVS1+9277C/T	171 (25,1)	115 (28,0)	0,31160	0,86 (0,65 – 1,13)
rs2506004	Intron1	c.73+9494C/A	IVS1+9494C/A	170 (24,9)	115 (28,0)	0,28623	0,85 (0,65 – 1,12)
rs1800858	Exon2	c.135G/A	Ala45Ala	169 (24,8)	112 (27,3)	0,39135	0,88 (0,66 – 1,16)
rs1800860	Exon7	c.1296G/A	Ala432Ala	230 (33,7)	139 (33,9)	0,99537	0,99 (0,77 – 1,29)
rs1799939	Exon11	c.2071G/A	Gly691Ser	152 (22,3)	94 (22,9)	0,86490	0,96 (0,72 – 1,29)
rs1800861	Exon13	c.2307T/G	Leu769Leu	162 (23,8)	89 (21,8)	0,50804	1,12 (0,83 – 1,50)
rs1800862	Exon14	c.2508C/T	Ser836Ser	33 (4,8)	12 (2,9)	0,16699	1,69 (0,86 – 3,30)
rs2472737	Intron14	c.2608-24G/A	IVS14-24G/A	111 (16,3)	99 (24,1)	<b>0,00183</b>	0,61 (0,45 – 0,83)
rs1800863	Exon15	c.2712C/G	Ser904Ser	152 (22,3)	94 (22,9)	0,86490	0,96 (0,72 – 1,29)
rs2565200	Intron19	c.3188-627C/T	IVS19-627C/T	130 (19,1)	77 (18,8)	0,97205	1,02 (0,74 – 1,39)
rs2435355	3'UTR	c.4461T/C		134 (19,7)	103 (25,1)	<b>0,04046</b>	0,73 (0,54 – 0,98)

Variantní alela je vyznačena tučně za lomítkem v označení polymorfismu na úrovni cDNA.

Rovněž byla studie zaměřena na korelaci studovaných variant s klinicko-patologickými daty pacientů. Byl posuzován vztah polymorfismu k velikosti nádoru, přítomnosti lokálních či vzdálených metastáz, k hladině kalcitoninu, k případné recidivě onemocnění a ke klinickému výstupu. V souboru 341 pacientů se sporadickým MTC bylo 169 pacientů bez recidivy onemocnění. Tito pacienti neměli v době studie lokální ani vzdálené metastázy, nicméně jsou nadále klinicky sledováni. Přehled klinicko-patologických dat pacientů s recidivou onemocnění je uveden v [Tab. 17](#).

**Tab. 17** Klinicko-patologická data pacientů s recidivou sporadického MTC

Pacienti s recidivou sporadického MTC (n=159)						
Lokální metastázy	Ano (n=116)		Ne (n=36)		NZ (n=7)	
Vzdálené metastázy	Ano (n=64)	Ne (n=52)	Ano (n=8)	Ne (n=28)	Ano (n=1)	NZ (n=6)
<b>Klinický výstup</b>						
Úmrtí	(n=8)					
Vzdálené metastázy	(n=56)		(n=8)		(n=1)	
Lokální metastázy			(n=52)			
Zvýšený CT bez lokalizovaných metastáz			(n=28)		(n=6)	

U některých pacientů nebylo možné dohledat všechna klinicko-patologická data. NZ: není známo. *Klinický výstup*: uvedena nejzávažnější současná anamnéza; pacienti se zvýšeným kalcitoninem (CT) nemají lokální ani vzdálené metastázy; pacienti s lokálními metastázami nemají vzdálené.

Variantní alely rs1864410, rs2435357, rs2506004 a rs1800858 byly zastoupeny signifikantně více u pacientů s TNM klasifikací T2–T4 vs. T1 ( $p=0,003$ ) a N1 vs. N0 ( $p=0,03-0,05$ ). Frekvence variantních alel u těchto souborů jsou porovnány v [Tab. 18](#).

**Tab. 18** Alelická distribuce studovaných variant v *RET* proto-onkogenu u pacientů se sporadickým MTC s TNM stadiem T1 vs. T2, T3 a T4 a N0 vs. N1

SNP (rs No)	T1 (n=120): Variant alela (%)	T2–T4 (n=175): Variant alela (%)	p-value ( $\chi^2$ )	OR (95% CI)	N0 (n=209): Variant alela (%)	N1 (n=104): Variant alela (%)	p-value ( $\chi^2$ )	OR (95% CI)
rs1864410	39 (16,3)	95 (27,1)	<b>0,00268</b>	1,92 (1,27 – 2,91)	87 (20,8)	60 (28,9)	<b>0,03291</b>	1,54 (1,05 – 2,26)
rs2435357	40 (16,7)	96 (27,4)	<b>0,00318</b>	1,89 (1,25 – 2,86)	90 (21,5)	60 (28,9)	<b>0,05483</b>	1,48 (1,01 – 2,16)
rs2506004	40 (16,7)	96 (27,4)	<b>0,00318</b>	1,89 (1,25 – 2,86)	89 (21,3)	60 (28,9)	<b>0,04650</b>	1,50 (1,02 – 2,19)
rs1800858	40 (16,7)	96 (27,4)	<b>0,00318</b>	1,89 (1,25 – 2,86)	88 (21,1)	60 (28,9)	<b>0,03922</b>	1,52 (1,04 – 2,23)
rs1800860	86 (35,8)	117 (33,4)	0,60600	0,90 (0,64 – 1,27)	152 (36,4)	57 (27,4)	<b>0,03163</b>	0,66 (0,46 – 0,95)
rs1799939	50 (20,8)	80 (22,9)	0,63015	1,13 (0,76 – 1,68)	103 (24,6)	40 (19,2)	0,15627	0,73 (0,48 – 1,10)
rs1800861	46 (19,2)	89 (25,4)	0,09317	1,44 (0,96 – 2,15)	88 (21,1)	55 (26,4)	0,15798	1,35 (0,91 – 1,99)
rs1800862	11 (4,6)	17 (4,9)	0,96536	1,06 (0,49 – 2,31)	16 (3,8)	14 (6,7)	0,16060	1,81 (0,87 – 3,79)
rs2472737	31 (12,9)	59 (16,9)	0,23359	1,37 (0,85 – 2,19)	55 (13,2)	44 (21,2)	<b>0,01365</b>	1,77 (1,14 – 2,74)
rs1800863	50 (20,8)	80 (22,9)	0,63015	1,13 (0,76 – 1,68)	103 (24,6)	40 (19,2)	0,15627	0,73 (0,48 – 1,10)
rs2565200	37 (15,4)	71 (20,3)	0,16332	1,40 (0,90 – 2,16)	73 (17,5)	41 (19,7)	0,56438	1,16 (0,76 – 1,77)
rs2435355	42 (17,5)	70 (20,0)	0,51324	1,18 (0,77 – 1,80)	69 (16,5)	52 (25,0)	<b>0,01521</b>	1,69 (1,12 – 2,53)

Variantní alela každého polymorfismu je uvedena v [Tab. 16](#).

Distribuce těchto 4 polymorfismů se také významně lišila u pacientů bez recidivy vs. s recidivou ( $p=0,01$ ) a pacientů bez lokální vs. s lokální recidivou ( $p=0,02$ ) ([Tab. 19](#)). Při porovnání pacientů se sporadickým MTC z hlediska přítomnosti vzdálených metastáz byla variantní alela polymorfismu v 7. exonu rs1800860 zastoupena více u pacientů bez vzdálených metastáz ( $p=0,03$ ).

Za pomoci programu Haploview byl identifikován haploblok tvořený polymorfismy rs1864410, rs2435357, rs2506004 a rs1800858, které jsou v silné vazebné nerovnováze. Program PHASE vygeneroval haplotypy tohoto haplobloku u každého jednotlivce

a odhadnul kombinace haplotypů na obou alelách. Distribuce haplotypů a diplotypů byla následně porovnána mezi pacienty se sporadickým MTC s recidivou a bez recidivy (Tab. 20) a bylo zjištěno, že se signifikantně liší ( $p=0,02$ ).

**Tab. 19** Alelická distribuce studovaných variant v *RET* proto-onkogenu u pacientů se sporadickým MTC s recidivou v porovnání s pacienty bez recidivy a u pacientů s lokálními metastázami vs. bez lokálních metastáz

SNP (rs No)	Pacienti s MTC				Lokální metastáza			
	Recidiva (n=159): Variantní alela (%)	Bez recidivy (n=169): Variantní alela (%)	p-value ( $\chi^2$ )	OR (95% CI)	Ano (n=116): Variant alela (%)	Ne (n=169): Variant alela (%)	p-value ( $\chi^2$ )	OR (95% CI)
rs1864410	91 (28,6)	66 (19,5)	<b>0,00840</b>	1,65 (1,15 – 2,37)	67 (28,9)	66 (19,5)	<b>0,01267</b>	1,67 (1,13 – 2,47)
rs2435357	91 (28,6)	69 (20,4)	<b>0,01858</b>	1,56 (1,09 – 2,24)	67 (28,9)	69 (20,4)	<b>0,02578</b>	1,58 (1,07 – 2,33)
rs2506004	91 (28,6)	68 (20,1)	<b>0,01439</b>	1,59 (1,11 – 2,28)	67 (28,9)	68 (20,1)	<b>0,02052</b>	1,61 (1,09 – 2,38)
rs1800858	91 (28,6)	67 (19,8)	<b>0,01105</b>	1,62 (1,13 – 2,33)	67 (28,9)	67 (19,8)	<b>0,01619</b>	1,64 (1,11 – 2,43)

V porovnávaném souboru pacientů bez lokálních metastáz byli zahrnuti pouze pacienti, kteří rovněž neměli ani vzdálené metastázy ani v současné době zvýšený kalcitonin

**Tab. 20** Distribuce haplotypů a diplotypů haplobloku 1. intronu a 2. exonu u pacientů se sporadickým MTC s recidivou vs. bez recidivy

Haplotyp	Recidiva (%) (n=159)	Bez recidivy (%) (n=169)	p-value (for $\chi^2$ )	OR (95% CI)	p-value (for OR)
1 TTAA	91 (28,6)	65 (19,2)	<b>0,00477</b>	1,68 (1,17 – 2,42)	<b>0,00633</b>
2 GCCG	227 (71,4)	269 (79,6)	<b>0,01449</b>	0,64 (0,45 – 0,92)	<b>0,01858</b>
Diplotyp	Recidiva (%) (n=159)	Bez recidivy (%) (n=169)	p-value (for $\chi^2$ )	OR (95% CI)	p-value (for OR)
1,1 TTAA,TTAA	8 (5,0)	9 (5,3)	0,90445	0,94 (0,35 – 2,50)	0,89724
1,2 TTAA,GCCG	75 (47,2)	47 (27,8)	<b>0,00029</b>	2,32 (1,47 – 3,67)	<b>0,00045</b>
2,2 GCCG,GCCG	76 (47,8)	110 (65,1)	<b>0,00159</b>	0,49 (0,32 – 0,77)	<b>0,00231</b>

\* Haplotypy/diplotypy s výskytem < 1% nebyly zahrnuty.

Publikace uvedených výsledků je v přípravě.



### 4.3.2 Diskuze

Vzhledem k variabilní expresivitě a penetranci, fenotypické heterogenitě a variabilitě věku onemocnění u pacientů s toutéž mutací se hledají jiné genetické změny v *RET* proto-onkogenu a jiné geny, které by se mohly podílet na vzniku a modulaci klinického projevu MTC. Z vazebných studií vyplývá, že i u pacientů, u kterých nebyla v *RET* proto-onkogenu detekována kauzální mutace, je *RET* proto-onkogen tím genem, který v patogenezi onemocnění má nejvýznamnější roli. Předpokládá se, že také běžné polymorfismy se mohou podílet na vzniku onemocnění a mají význam modifikujících faktorů, schopných ovlivnit expresi a vlastnosti proteinu. Uvažuje se o významu polymorfismů, zejména ve 2., 7., 11., 13., 14. a 15. exonu a intronických variant v *RET* proto-onkogenu, které mohou dle některých publikací predisponovat k rozvoji MTC či modifikovat fenotypické projevy (Lesueur et al. 2006, Ceolin et al. 2012, Lantieri et al. 2013).

O přesném mechanismu vlivu polymorfismů na vznik či progresi MTC se stále spekuluje, zatím bylo provedeno jen málo funkčních studií. Záměna bazí v DNA může narušit či vytvořit alternativní místo sestřihu vedoucí k syntéze alterovaného proteinu s jinou kapacitou vazebných míst pro ligandy než původní protein. Polymorfismy také mohou pozměnit strukturu mRNA, což ovlivní její stabilitu či počet kopií. I neutrální varianta navíc může být ve vazebné nerovnováze s jinou neznámou funkční variantou. U nesynonymních polymorfismů se předpokládá vliv na dimerizaci *RET* proteinu či tvorbu nových fosforylačních míst v tyrozinkinázové doméně.

Přesto některé studie tyto hypotézy vyvracejí, např. nebyly zjištěny rozdíly v množství mRNA v závislosti na jednotlivých polymorfismech (Elisei et al. 2004), další studie ukazuje, že polymorfismus Ser836Ser ve 14. exonu neovlivňuje sestřih RNA a stabilitu transkriptu (Griseri et al. 2000).

V naší studii byly frekvence 12 vytipovaných polymorfismů porovnávány mezi soubory pacientů a souborem zdravých kontrol. Byly vybrány polymorfismy, které se vyskytují v rizikových, rutinně screenovaných exonech, ve kterých se nachází většina kauzálních mutací, ale také různé varianty v nekódujících intronových částech genu. Při porovnání distribuce studovaných polymorfismů mezi pacienty a kontrolami pouze varianta ve 14.

intronu (rs2472737) a v 3'UTR (rs2435355) byly signifikantně odlišné. U ostatních polymorfismů nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

Mezi často studovanými polymorfismy pouze jediný způsobuje substituci aminokyselin, a to rs1799939 (Gly691Ser) v 11. exonu *RET* proto-onkogenu. Proto se stal prvním studovaným polymorfismem v souvislosti s MTC. Některé studie jej popisují v asociaci s MTC (Elisei et al. 2004, Cebrian et al. 2005), jiné ji vyvracejí (Baumgartner-Parzer et al. 2005, Siqueira et al. 2010, Sromek et al. 2010, Ceolin et al. 2012). Byla popsána souvislost minoritní alely polymorfismu Gly691Ser s věkem pacienta v době diagnózy (Robledo et al. 2003), přičemž homozygoti AA byli o 10 let mladší než heterozygoti GA či wild type GG. Téměř všechny studie včetně této naší potvrdily kosegregaci a silnou vazebnou nerovnováhu Gly691Ser a polymorfismu rs1800863 (Ser904Ser) v 15. exonu.

Také polymorfismus rs1800861 (Leu769Leu) ve 13. exonu je popisován s mladším věkem nástupu onemocnění (Sromek et al. 2010) či vyšší frekvencí variantních alel než u kontrol (Ceolin et al. 2012) a naopak studie, ve kterých není asociován s MTC (Elisei et al. 2004, Cebrian et al. 2005, Siqueira et al. 2010).

Polymorfismus rs1800862 (Ser836Ser) ve 14. exonu *RET* proto-onkogenu je méně častou variantou v populaci i u pacientů, a proto je homozygot minoritní alely zaznamenán jen zcela raritně, v našem souboru pouze u jedné kontroly. I tento polymorfismus byl popsán s vyšší frekvencí variantní alely v souborech pacientů s MTC (Gimm et al. 1999, Ruiz et al. 2001, Baumgartner-Parzer et al. 2005, Ceolin et al. 2012) a časnějším nástupem onemocnění či vývojem metastáz (Siqueira et al. 2010). Byla také popsána korelace Ser836Ser se somatickou mutací Met918Thr v 16. exonu (Gimm et al. 1999, Ruiz et al. 2001). Jiné studie naopak nenašly spojitost s MTC (Elisei et al. 2004, Baumgartner-Parzer et al. 2005, Cebrian et al. 2005, Lesueur et al. 2006, Sromek et al. 2010).

Mnohé studie se tedy ve svých závěrech velmi rozcházejí. Také my jsme u jmenovaných polymorfismů nenašli žádnou asociaci s MTC. Tyto velké rozdíly mohou vyplývat z klinické heterogenity případů s MTC, odlišnostmi etnickými, geografickými či v genetickém pozadí nebo jinou metodologií.

Zaměřili jsme se také na polymorfismy ne tak často studované, jelikož se nenacházejí v rizikových exonech - polymorfismus rs1800858 (Ala45Ala) ve 2. exonu a rs 1800860 (Ala432Ala) v 7. exonu. Oba mají srovnatelné zastoupení u pacientů i kontrol, ovšem při korelaci s klinicko-patologickými daty pacientů s MTC bylo zjištěno, že pacienti s variantní alelou Ala45Ala mají horší prognózu (velikost nádoru, postižení lymfatických uzlin), naopak u variantní alely Ala432Ala se zdá, že má protetivní roli.

Z intronických variant jsme studovali polymorfismus rs2472737 (IVS14-24G/A) ve 14. intronu *RET* proto-onkogenu. Varianta je lokalizována 24 nukleotidů před začátkem 15. exonu a spekuluje se, že záměna bazí může díky její poloze ovlivnit sestřih RNA. V našem souboru pacientů byla variantní alela asociována s horší prognózou, přítomností lokálních metastáz. V jiné studii byla více zastoupena u pacientů s MTC vs. zdravé kontroly a u pacientů s vysokými hladinami calcitoninu (Baumgartner-Parzer et al. 2005).

Jedním z cílů této studie bylo také se zaměřit na varianty v 1. intronu a 2. exonu, u kterých byla zaznamenána souvislost s vysokým rizikem pro vznik HSCR (viz kapitola 4.5). Tyto varianty jsou v silné vazebné nerovnováze a tvoří jeden haploblok. Podle našich zjištění nebyla studie těchto polymorfismů u pacientů s MTC dosud žádnou laboratoří provedena či zveřejněna s výjimkou polské studie (Borun et al. 2012), ve které byla porovnána frekvence polymorfismu rs2435357 mezi souborem 48 pacientů s MTC a souborem 152 zdravých kontrol. Zatímco heterozygot C/T byl u polské zdravé populace zastoupen ve 12 %, u pacientů s MTC nebyla variantní alela T nalezena vůbec. Polymorfismus rs2435357 je lokalizován v enhanceru *RET* proto-onkogenu. Varianta T snižuje enhancerovou aktivitu, což souvisí s vysokým rizikem pro vznik HSCR. Autoři se domnívají, že přítomnost varianty T může v populaci snižovat riziko vzniku MTC. V naší studii (provedené na vícečetných souborech) byly ovšem frekvence tohoto polymorfismu u pacientů a kontrol srovnatelné (heterozygoti C/T u obou souborů 38 %) a na rozdíl od polské studie byli v obou skupinách zastoupeni dokonce homozygoti TT (6 % vs. 9 %).

Přestože se distribuce studovaných variant 1. intronu a 2. exonu signifikantně nelišila mezi kontrolním souborem a pacienty, při korelaci s klinicko-patologickými daty byly zjištěny významné asociace minoritních alel s horším průběhem onemocnění, konkrétně

s klasifikací nádorů TNM (rozsahem nádoru a přítomností metastáz regionálních krčních lymfatických uzlin a vzdálených metastáz) a recidivou onemocnění. Pacienti s recidivou, lokálními metastázami a klasifikací T2-T4 mají větší zastoupení minoritní alely (27 %) než pacienti bez recidivy, lokálních metastáz a klasifikací T1 (16%). Je ale zajímavé, že pacienti s recidivou, lokálními metastázami a klasifikací T2-T4 mají zastoupení minoritní alely srovnatelné s kontrolami (28 %). Zdá se, že přítomnost minoritní alely nesouvisí se vznikem onemocnění, ale s jeho modulací a je u pacientů spojena s vyšším rizikem, že onemocnění bude mít horší průběh.

#### **4.3.3 Shrnutí**

Zjištěná data ukazují na možný vliv některých variant v *RET* proto-onkogenu na onemocnění MTC. Zdá se, že haplotyp v oblasti 1. intronu a 2. exonu *RET* proto-onkogenu má vliv na progresi MTC. Minoritní alela rs2435355 má protektivní charakter. U rs1864410, rs2435357, rs2506004 a rs1800858 byl zaznamenán možný modifikující efekt v souvislosti s horším průběhem onemocnění - recidivou a klasifikací TNM. Na základě studií polymorfismů bude v budoucnu možné predikovat horší prognózu či agresivnější typ tumoru a modulovat tak i léčbu pacientů.

## 4.4 Detekce zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu u pacientů s HSCR

### 4.4.1 Výsledky

U pacientů s HSCR bylo vzhledem ke zvýšenému riziku manifestace MTC analyzováno šest rizikových exonů (10., 11., 13., 14., 15. a 16. exon) *RET* proto-onkogenu. Při hledání zárodečných mutací spojených s HSCR bylo u většiny pacientů vyšetření rozšířeno také na další exony genu. Zárodečné mutace byly nalezeny u 28 pacientů s HSCR, tj. 13,1 % (Tab. 21, 22). U dvou rodin (3 pacientek s TCA a 1 členky rodiny bez HSCR) byly v 10. exonu detekovány klasické zárodečné mutace s duálním charakterem (Cys609Tyr, Cys620Arg). Tyto mutace v cysteinových kodónech u všech čtyř nositelek způsobily také MTC, popř. hyperplázii C-buněk (CCH), a to právě i u zdánlivě zdravé nositelky mutace, u níž byl MTC potvrzen až histologicky po profylaktické totální thyreoidektomii. Další skupinu detekovaných mutací tvoří zárodečné mutace dosud nalezené u familiárních forem MTC - u 2 pacientů byla detekována Ser649Leu v 11. exonu a u 9 pacientů se jednalo o Tyr791Phe ve 13. exonu. Pacienti s těmito mutacemi měli především krátkou formu HSCR, pouze 2 pacienti měli TCA. Pacientům bylo doporučeno vyšetření endokrinologem, kde budou pravidelně sledováni kvůli riziku MTC. Třetí skupinu pak tvořily nově objevené a dosud nepopsané mutace *RET* proto-onkogenu. U pacientů s krátkou formou HSCR byla nalezena mutace Val373Ala v 6. exonu, u pacienta s dlouhou formou Ala680Thr v 11. exonu, u pacientů s totální aganglionózou tlustého střeva byly objeveny mutace Pro566Leu v 9. exonu, del630A v 10. exonu a Tyr798Ser ve 13. exonu a u pacientů s totální intestinální aganglionózou byly objeveny mutace Ser339Leu v 5. exonu a Arg969Gly v 17. exonu. Také byla zaznamenána tichá mutace Gly539Gly v 8. exonu v rodině se 4 postiženými členy s různými formami onemocnění a Tyr806Tyr ve 14. exonu u pacienta s blíže nespecifikovanou formou onemocnění. Všechny tyto neznámé, dosud nepopsané varianty byly analyzovány *in silico* pomocí třech různých algoritmů (PolyPhen-2, SIFT, Align-GVGD) a byla tak predikována jejich patogenita a schopnost ovlivnit funkci proteinu (Tab. 23).

**Tab. 21** Záchyt zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu u pacientů s HSCR

Typ mutace	Pacient	Exon	Mutace/Protein	Mutace/cDNA	Forma HSCR	Histologie štítné žl.
<b>Typická duální <i>RET</i> mutace</b>	A1	10	Cys609Tyr	c.1826G>A	TCA	MTC
	B1	10	Cys620Arg	c.1858T>C	TCA	CCH
	B2	10	Cys620Arg	c.1858T>C	TCA	MTC
<b><i>RET</i> mutace s rizikem pro vznik MTC</b>	C1	11	Ser649Leu	c.1946C>T	RS-HSCR	
	D1	11, 13	Ser649Leu + Tyr791Phe	c.1946C>T + c.2372A>T	TCA	
	E1	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	RS-HSCR	
	F1	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	TCA	
	F2	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	RS-HSCR	
	G1	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	RS-HSCR	
	H1	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	RS-HSCR	
	I1	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	RS-HSCR	
	J1	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	RS-HSCR	
	K1	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	RS-HSCR	
	L1	13	Tyr791Phe	c.2372A>T	LCA	
<b>Nové <i>RET</i> mutace s neznámou funkcí</b>	M1	5	Ser339Leu	c.1016C>T	TIA	
	M2	6	Ala373Val	c.1118C>T	RS-HSCR	
	M3	8	Gly539Gly	c.1617C>T	UKS	
	M4	8	Gly539Gly	c.1617C>T	LCA	
	N1	8	Gly539Gly	c.1617C>T	LCA	
	O1	8	Gly539Gly	c.1617C>T	NTSBA	
	P1	9	Pro566Leu	c.1697C>T	TCA	
	Q1	IVS9		c.1760-2_-1delAG	NTSBA	
	R1	10	Lys603delA	c.1809delA	TCA	
	S1	11	Ala680Thr	c.2038G>A	LCA	
	T1	13	Gly798Ser	c.2392G>A	TCA	
	U1	14	Tyr806Tyr	c.2418C>T	?	
	V1	17	Arg969Gly	c.2905C>G	TIA	
V2	17	Arg969Gly	c.2905C>G	?		

**Tab. 22** Záchyt zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu dle fenotypu onemocnění

Pacienti s HSCR (n=214)						
Fenotyp HSCR	S-HSCR		L-HSCR			
Počet pacientů	139		58			
Záchyt mutací	9		16			
Záchyt mutací (%)	6,5 %		27,6 %			
Fenotyp HSCR	RS-HSCR	LCA	TCA	NTSBA	TIA	
Počet pacientů	139	24	27	5	2	
Záchyt mutací	9	4	8	2	2	
Záchyt mutací (%)	6,5 %	16,7 %	29,6 %	40 %	100 %	

Fenotyp onemocnění rozlišován (1) dle genetické klasifikace na krátkou (S-HSCR) a dlouhou (L-HSCR) formu a (2) dle chirurgické klasifikace na RS-HSCR, LCA, TCA, NTSBA a TIA. Pacienti s blíže nespecif. formou HSCR (n=16) v tab. neuvedeni. Pacienti s UKS nezařazeni do studie s výjimkou jednoho člena rodiny s familiární formou HSCR, proto záchyt u UKS v tab. rovněž neuveden.

**Tab. 23** *In silico* analýzy zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu detekovaných u pacientů s HSCR

Exon	Mutace	Polyphen	SIFT	Align GVGD
5	Ser339Leu	Benigní	Tolerována	C65
6	Ala373Val	Benigní	Tolerována	C65
9	Pro566Leu	Benigní	Netolerována	C65
10	Cys609Tyr	Pravděpodobně patogenní	Netolerována	C65
10	Cys620Arg	Pravděpodobně patogenní	Netolerována	C65
11	Ser649Leu	Pravděpodobně patogenní	Tolerována	C65
11	Ala680Thr	Benigní	Tolerována	C55
13	Tyr791Phe	Možná patogenní	Netolerována	C15
13	Gly798Ser	Pravděpodobně patogenní	Tolerována	C55
17	Arg969Gly	Pravděpodobně patogenní	Netolerována	C65

**Polyphen:** stupnice od „benigní“ záměny aminokyseliny přes „možná patogenní“ (menší jistota predikce) k „pravděpodobně patogenní“ (větší jistota predikce); **SIFT:** Záměna aminokyseliny v proteinu tolerována či netolerována; **Align GVGD:** stupnice od C0 (s nejmenší pravděpodobností patogenní) až k C65 (s největší pravděpodobností patogenní)

**Příloha č. 14:** Skaba R, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Vlcek P, Frantlova M, Bendlova B. The risk of medullary thyroid carcinoma in patients with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(12): 991-995. (IF – 1,061)

**Příloha č. 15:** **Vaclavikova E**, Kavalcova L, Skaba R, Dvorakova S, Macokova P, Rouskova B, Bendlova B. Hirschsprung's disease and medullary thyroid carcinoma: 15-year experience with molecular genetic screening of the *RET* proto-oncogene. *Pediatr Surg Int* 2012; 28(2): 123-128. (IF – 1,061)

#### 4.4.2 Diskuze a komentář k přílohám č. 14–15

Systematický screening zárodečných mutací *RET* proto-onkogenu u pacientů s HSCR není celosvětově běžnou praxí. V některých centrech je sice rutinní screening zaveden, jedná se ale většinou pouze o vyšetření mutací v 10. exonu *RET* proto-onkogenu, a to často jen u pacientů s L-HSCR, kde se riziko MTC udává vyšší. Mnoho publikací, ve kterých se autoři

zaměřili na hledání zárodečných mutací v ostatních rizikových exonech genu, popř. vyšetření rozšířili na celý gen, neexistuje. Nejčastěji jsou popisovány kazuistiky pacientů s detekovanou mutací v 10. exonu v cysteinových kodónech 609, 611, 618 a 620, u kterých byl kromě HSCR později zastižen i MTC. Koexistence obou dvou onemocnění je velice vzácná, uvádí se data srovnatelná s naším souborem (Pakarinen et al. 2005, Amiel et al. 2008). Mutace, které u pacienta obě onemocnění současně způsobí, mají duální charakter, tzn. že jsou aktivující i inaktivující, a v závislosti na tkáni, kde je *RET* exprimován, způsobí ve střevě ztrátu funkce proteinu a poruchu migrace neuroblastů, zatímco ve štítné žláze vyvolají nekontrolovatelnou aktivaci proteinu a spuštění nádorového procesu (Santoro et al. 1995). Tyto popisované mutace mají nejzávažnější dopad a mutace v kodónu 620 je zachycena v 50 % těchto případů, z nichž nejčastěji se jedná o záměnu Cys620Arg (Dvořáková et al. 2005). Studie ukazují, že čím jsou mutace blíže k transmembránové doméně, tím mohou hrát významnější úlohu při buněčné proliferaci a aktivaci nádorového procesu (Kjaer et al. 2006, Moore et al. 2012). Tímto zjištěním lze objasnit skutečnost, proč jsou mutace v kodónu 620 u pacientů se sdružením HSCR a MEN 2/FMTC častější než v ostatních cysteinových kodónech 10. exonu. Poloha 10. exonu odpovídá extracelulární doméně tyrozinkinázového receptoru, ale již 11. exon částečně koresponduje s transmembránovou doménou a kodón 620 má ze zmíněných cysteinových kodónů k transmembránové doméně nejbližší.

V našem souboru byly detekovány zárodečné mutace u 28 pacientů s HSCR (13,1 %). Podíváme-li se na záchyt zárodečných mutací v závislosti na fenotypu onemocnění (Tab. 22), vysoká detekce mutací byla u pacientů s TCA; 8 z 27 (29,6 %) vyšetřených pacientů mělo detekovanou mutaci v *RET* proto-onkogenu. Mutace byla zjištěna také u čtyř z 24 pacientů s LCA (16,7 %), avšak ve dvou případech se jednalo o sourozence s tichou mutací. Pacienti s krátkou formou měli záchyt 6,5 %. Nejvyšší záchyt byl u pacientů s nejtěžšími formami HSCR. Mutace v *RET* proto-onkogenu byla detekována u obou pacientů s nejzávažnější TIA a u dvou z 5 pacientů s NTSBA (40 %). Jiné studie uvádějí záchyt mutací v *RET* proto-onkogenu u NTSBA/TIA kolem 70 % (Tomiya et al. 2001, Solari et al. 2003, Ruttenstock et al. 2009). Většinou jsou mutace detekovány po celé délce genu, často mimo exony vyšetřované kvůli riziku MTC. Dalším faktorem vysokého zachytu v jiných studiích je započítávání běžných polymorfismů (Shimotake et



al. 1997, Ishii et al. 2013). HSCR je ovšem polygenní onemocnění a je možné, že za vzácnými excesivními formami u našich pacientů stojí také alterace v jiných genech.

Zmíněné duální mutace byly zaznamenány ve dvou českých rodinách – v jedné Cys609Tyr a ve druhé Cys620Arg, a u obou byly objeveny v retrospektivní analýze. Na příkladech těchto dvou rodin lze demonstrovat oprávněnost velmi přísných doporučení ohledně výkonu profylaktické totální thyreoidektomie (TTE) u těchto mutací (Kloos et al. 2009). V první rodině byla probandce diagnostikována a chirurgicky léčena TCA ve věku 3 měsíců. V 21 letech byl u pacientky zjištěn agresivní MTC a po následném odhalení zárodečné mutace Cys609Tyr byla tatáž mutace nalezena také u její matky, která neměla HSCR ani žádné příznaky onemocnění štítné žlázy. Teprve po dvouleté diskuzi přistoupila matka probandky k profylaktické TTE. Přestože vyšetření štítné žlázy ultrazvukem i hladiny kalcitoninu byly před operací normální, histologicky byl již potvrzen nálezn MTC a PTC in situ. Vidíme zde, jak variabilní penetranci může mutace Cys609Tyr také mít. Ve druhé rodině měla probandka i její matka diagnostikovanou TCA. Genetické vyšetření odhalilo zárodečnou mutaci Cys620Arg u obou pacientek. Obě poté podstoupily profylaktickou TTE s nálezem CCH u tehdy 8leté probandky a MTC u její 28leté matky. Je zřejmé, že přísná doporučení, která u těchto mutací indikují provést profylaktickou TTE do 5 let věku nositele mutace, jsou oprávněná, jestliže u teprve 8leté nositelky mutace byla již zastižena CCH, tedy preneoplastický proces. Případ této rodiny je navíc dokladem přínosu cíleného screeningu s negativním výsledkem, díky kterému mohli být dva později narození sourozenci probandky vyloučeni z rizika MTC i HSCR.

Dalším výstupem screeningu zárodečných mutací v našem souboru pacientů s HSCR byla překvapivě vysoká detekce mutace Tyr791Phe ve 13. exonu. Mutace byla detekována u 8 rodin (9 pacientů a 4 zdravých nositelů mutace), u 11 cíleně testovaných příbuzných byla vyloučena. Pacienti měli především krátkou rekto-sigmoideální formu HSCR, ve dvou případech se jednalo o TCA. Mutace byla v době jejího nález u pacientů dle světových studií považována za aktivující mutaci způsobující MTC, s nízkou penetrancí, fenotypickou heterogenitou a variabilitou věku onemocnění (Václavíková et al. 2009), u které se podle mezinárodních doporučení provádí profylaktická TTE mezi 5. a 10. rokem věku (Kloos et al. 2009). Nositelům mutace v našem souboru se dalo na zvážení, zda přistoupí

k profylaktické TTE či zvolí méně radikální postup a budou pouze dispenzarizováni na endokrinologii. Profylaktickou TTE nezvolil vzhledem k její nízké agresivitě ani jeden nositel mutace, zatím jsou pravidelně sledovány hladiny kalcitoninu. Později se však objevila studie (Erlic et al. 2010), která popisuje tuto variantu jako polymorfismus. Kontroverznost a úskalí interpretace účinku této varianty v současné době byla již rozebrána v kapitole 4.1.2.3. Stejně tak byla ve zmíněné studii zpochybněna kauzální úloha varianty Ser649Leu, kterou jsme našli u 2 našich pacientů, s rekto-sigmoideální formou v prvním a TCA ve druhém případě, kde byla tato varianta navíc detekována spolu s Tyr791Phe. Mutace Ser649Leu byla dříve popsána u MTC (Wiench et al. 2001, Vierhapper et al. 2004, Colombo-Benkman et al. 2008) jako mutace s nízkou penetrancí a agresivitou onemocnění. V jedné funkční studii, kde byl účinek Ser649Leu studován pomocí vektorů, nebyl však oproti wild-type RET proteinu zjištěn signifikantní nárůst transformovaných buněk v tkáňové kultuře NIH3T3 (Prazeres et al. 2011). *In silico* analýzy (PolyPhen, MutPred, PSAAP) naopak pomocí různých algoritmů posoudily mutaci jako patogenní (Crockett et al. 2010, Crockett et al. 2011).

Nově detekované varianty byly otestovány *in silico* pomocí tří modelů odhadující škodlivost mutace - PolyPhen-2, SIFT a Align-GVGD (Tab. 23). Pouze mutace Arg969Gly v 17. exonu byla přesvědčivě určena jako patogenní všemi třemi algoritmy. Delece c.1809delA způsobí posunutí čtecího rámce od kodónu Ala604 v délce 33 bp, kde končí stop kodónem. Aberantní mRNA s předčasně zařazeným stop kodónem je pak pravděpodobně rozštěpána mechanismem nonsense mediated decay. Zajímavá je i 2 bp delece c. 1760-2\_1760-1delAG na konci 9. intronu v místě konsenzuální sekvence pro řízení sestřihu RNA. Tato delece, která pravděpodobně způsobí abnormální sestřih, byla již v odborné literatuře popsána u pacienta s HSCR (So et al. 2011), ale také jako somatická v nádorové tkáni u pacienta s feochromocytomem (Beldjord et al. 1995). Je tedy možné, že může mít aktivující i inaktivující funkci. Ostatní záměny každý algoritmus předkládá s různými výstupy. Je zřejmé, že jednotlivé algoritmy na posuzování dopadu mutace se mohou ve výstupu výrazně lišit a je těžké dle nich usuzovat na její patogenitu. Spolehlivější metodou jsou jistě funkční studie konkrétní mutace, ale při vysoké detekci neznámých variant je dnes komfortnější přistoupit nejprve k *in silico* analýze a v souladu s jejími výstupy odfiltrovat benigní varianty. Z našich výsledků však vyplývá, že nelze

vynášet závěry pouze na základě jednoho algoritmu a je nutné dané záměny porovnat z několika úhlů pohledu.

#### **4.4.3 Shrnutí**

Z našich výsledků vyplývá, že je prospěšné u všech pacientů s HSCR vyšetřovat zárodečné mutace *RET* proto-onkogenu. Screening klasických duálních mutací v 10. exonu dokázal zachytit medulární karcinom štítné žlázy i v časně fázi nebo dokonce v preklinickém stadiu onemocnění. Největší klinický dopad na pacienta mají aktivující mutace v 10. exonu spojené s rizikem MEN 2/FMTC a v našem souboru byly zjištěny pouze u pacientek s TCA. Přesto oproti některým pracovištím (Bütter et al. 2007, Kloos et al. 2009) preferujeme sekvenování všech rizikových exonů *RET* proto-onkogenu, a to u všech forem HSCR. Je pravda, že u nově detekovaných mutací a dle nových poznatků ani u mutací v kodónu 649 a 791 nemůžeme s jistotou tvrdit, že zvyšují riziko MTC, pacient ale může být na základě detekované mutace alespoň pod dohledem odborníka. Samozřejmě tu hrají roli finanční náklady genetického vyšetření i celoživotní dispenzarizace u endokrinologa, na prvním místě by ale mělo být zdraví a prospěch pacienta, nehledě na to, že léčba karcinomu štítné žlázy je finančně mnohem náročnější. Mutace, které jsou detekovány po celé délce *RET* proto-onkogenu, mohou být navíc kauzální v souvislosti s HSCR a i to může být informace zajímavá pro pacienta a jeho genetického poradce - klinického genetika.

## 4.5 Studium polymorfismů v *RET* proto-onkogenu u pacientů s HSCR

### 4.5.1 Výsledky

Ke studiu modifikujícího účinku polymorfismů na vznik a fenotypické projevy Hirschsprungovy choroby bylo vytipováno 14 variant v *RET* proto-onkogenu. Zaměřili jsme se na varianty detekované v rutinně screenovaných exonech, rizikových pro vznik MTC, ale také v zajímavých intronových a nekódujících oblastech genu. V souboru pacientů s HSCR byly v distribuci polymorfismů objeveny signifikantní odlišnosti od zdravých kontrol u 11 studovaných variant (Tab. 24). Zvláště vysoké riziko (OR=6,67; CI 95% (4,82-9,23),  $p < 0.000001$ ) bylo shledáno v souvislosti se 4 studovanými polymorfismy - rs1864410, rs2435357, rs2506004 (1. intron) a rs1800858 (2. exon), které tvořily jeden haploblok. Tyto 4 varianty byly ve vzájemné vazebné nerovnováze a se stejnou genotypickou distribucí u téměř každého jedince. Zatímco u zdravých kontrol se variantní alela vyskytovala pouze ve 28 %, u pacientů dominovala se zastoupením v 72 %. Proto také nejčastější haplotypy byly zjištěny pouze dva – TTAA, který převažoval u pacientů (70,7 %), a GCCG, který převažoval u kontrol (71,2 %). Také další dva polymorfismy rs1800861 (13. exon) a rs2565200 (19. intron), jejichž variantní alely byly více zastoupeny u pacientů (postupně 43,5 % a 41,0 %) než u kontrol (21,8 % a 18,8 %), byly spojeny se zvýšeným rizikem (OR=2,76; CI 95% (2,00-3,81) a OR=3,01; CI 95% (2,16-4,20), oba  $p < 0.000001$ ). U všech 6 variant bylo zjištěno větší zastoupení variantní alely u mužů než u žen a stejně tak u krátké vs. dlouhé formy HSCR. Naopak varianty rs1800860, rs1799939 a rs1800863 (7., 11., 15. exon) mají protektivní účinek. Vliv polymorfismů v 3' oblasti genu byl také přezkoumán nezávisle na efektu haplobloku v 5' oblasti genu, kdy byla distribuce polymorfismů porovnána mezi nositeli rizikového TTAA a běžného GCCG haplotypu. I poté si polymorfismy zachovaly svoji rizikovou/protektivní roli a rozdíly mezi oběma formami onemocnění se ještě více prohloubily.

**Tab. 24** Alelická distribuce studovaných variant v *RET* proto-onkogenu u pacientů s HSCR a u kontrol

SNP (rs No)	Exon/ Intron	Záměna (DNA)	Záměna (Protein)	HSCR (n=162): Variantní alela (%)	Kontroly (n=205): Variantní alela (%)	p-value ( $\chi^2$ )	OR (95% CI)
rs1864410	Intron1	c.73+2846G/T	IVS1+2846G/T	233 (71,9)	113 (27,6)	<b>0,00000</b>	6,73 (4,86 – 9,31)
rs2435357	Intron1	c.73+9277C/T	IVS1+9277C/T	234 (72,2)	115 (28,0)	<b>0,00000</b>	6,67 (4,82 – 9,23)
rs2506004	Intron1	c.73+9494C/A	IVS1+9494C/A	234 (72,2)	115 (28,0)	<b>0,00000</b>	6,67 (4,82 – 9,23)
rs1800858	Exon2	c.135G/A	Ala45Ala	231 (71,3)	112 (27,3)	<b>0,00000</b>	6,61 (4,78 – 9,14)
rs1800860	Exon7	c.1296G/A	Ala432Ala	82 (25,8)	139 (33,9)	<b>0,01816</b>	0,68 (0,49 – 0,94)
rs1799939	Exon11	c.2071G/A	Gly691Ser	27 (8,3)	94 (22,9)	<b>0,00000</b>	0,31 (0,19 – 0,48)
rs1800861	Exon13	c.2307T/G	Leu769Leu	141 (43,5)	89 (21,8)	<b>0,00000</b>	2,76 (2,00 – 3,81)
rs111264957	Intron13	c.2393-94C/T	IVS13-94C/T	6 (1,9)	12 (2,9)	0,34978	0,63 (0,23 – 1,69)
rs1800862	Exon14	c.2508C/T	Ser836Ser	8 (2,5)	12 (2,9)	0,70528	0,84 (0,34 – 2,08)
rs2472737	Intron14	c.2608-24G/A	IVS14-24G/A	82 (25,3)	99 (24,1)	0,71678	1,06 (0,76 – 1,49)
rs1800863	Exon15	c.2712C/G	Ser904Ser	28 (8,6)	94 (22,9)	<b>0,00000</b>	0,32 (0,20 – 0,50)
rs2565200	Intron19	c.3188-627C/T	IVS19-627C/T	133 (41,0)	77 (18,8)	<b>0,00000</b>	3,01 (2,16 – 4,20)
rs143948954	3'UTR	c.4391G/C		8 (2,5)	2 (0,5)	<b>0,02149</b>	5,16 (1,09 – 24,49)
rs2435355	3'UTR	c.4461T/C		105 (32,6)	103 (25,1)	<b>0,02579</b>	1,44 (1,04 – 1,99)

**Příloha č. 16:** Vaclavikova E, Dvorakova S, Skaba R, Pos L, Sykorova V, Halkova T, Vcelak J, Bendlova B. *RET* variants and haplotype analysis in a cohort of Czech patients with Hirschsprung disease. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e98957. doi:10.1371/journal.pone.0098957 (IF – 3,534)

#### 4.5.2 Diskuze a komentář k příloze č. 16

Vazebná analýza u pacientů s HSCR ukazuje, že onemocnění je spojeno s *RET* proto-onkogenem zpravidla i v případě, kdy nebyla detekována žádná mutace (Lantieri et al. 2006). Proto se předpokládá, že i nekódující varianty a běžné polymorfismy mohou mít např. v konkrétním haplotypu modifikující roli a vliv v patogenezi onemocnění. Z vytipovaných 14 polymorfismů právě varianty v 1. intronu a 2. exonu (rs1864410, rs2435357, rs2506004, rs1800858) ukazují, jak výrazně jsou s chorobou asociovány, když variantní alely, které jsou u normální populace zastoupeny pouze ve 28 %, se u pacientů projevují jako dominantní v 72 %. Naše kontrolní populace byla porovnána s dostupnými daty evropské normální populace a frekvence studovaných polymorfismů jsou srovnatelné (Lesueur et al. 2002). Haplotyp TTAA, který je definován variantními alelami zmíněných polymorfismů, je spojen s vysokým rizikem (OR=6,83) a homozygotní diplotyp TTAA,TTAA riziko ještě zvyšuje (OR=17,56). Tato zjištění jsou konzistentní s jinými studiemi, ze kterých vyplývá, že uvedené polymorfismy se nacházejí ve 27 kb dlouhé vysoce konzervované oblasti zvané MCS+9.7 (Multispecies conserved sequence). Ta začíná 4 kb před transkripčním startovním místem *RET* proto-onkogenu a pokrývá oblast až do 2. exonu. Haplotyp TTAA snižuje promotorovou aktivitu, vazebnou afinitu TTF-1 (thyroid transcription factor 1), narušuje vazebné místo pro transkripční faktor SOX10, a tak reguluje expresi *RET* proteinu, což bylo potvrzeno *in vitro* (Burzynski et al. 2005, Garcia-Barcelo et al. 2005, Emison et al. 2010, Sribudiani et al. 2011).

Některé předchozí studie navrhují hypotézu o rozdílné roli polymorfismů ve dvou různých oblastech, kdy vedle rizikového haplotypu v 5' oblasti genu existuje naopak protektivní 3' oblast. Ta má obsahovat celou řadu markerů počínaje rs1799939 v 11. exonu až do 3'UTR (Lantieri et al. 2006, Griseri et al. 2007, Pan et al. 2012). Z našich výsledků ale vyplývá, že nelze označit 3' oblast za protektivní, protože kromě protektivních polymorfismů rs1799939 a rs1800863 jsme v této části genu zaznamenali u pacientů i varianty spojené se zvýšeným rizikem oproti běžné populaci. Jedná se o rs2565200 v 19. intronu, rs2435355 v 3'UTR a rs1800861 ve 13. exonu, který byl jako rizikový popsán již dříve (Lantieri et al. 2006, Tou et al. 2011). Riziko spojené s variantními alelami polymorfismů rs1800861 a rs2565200 bylo námi potvrzeno i nezávisle na efektu

haplobloku v 5' oblasti. Polymorfismus rs2435355 v 3'UTR byl u čínských pacientů označen za protektivní (Pan et al. 2012). Nesoulad mezi našimi výsledky a teorií o 3' protektivní oblasti proto může být způsoben odlišnými studovanými soubory a etnickými rozdíly.

Dalším naším významným cílem bylo posoudit vliv studovaných polymorfismů na agresivitu onemocnění (krátkou a dlouhou formu HSCR) a také, zda hraje roli pohlaví pacienta v souvislosti s polymorfismy. Zajímavé je, že ačkoli u obou forem HSCR bylo riziko spojené s variantními alelami 5' haplobloku vysoké, frekvence těchto rizikových alel byly o 6 % vyšší u méně agresivní krátké formy HSCR. Podobný rozdíl byl zpozorován u rs2435357 (Emison et al. 2010) a rs1800858 (Fitze et al. 2002), ale v některých studiích žádné odlišnosti nalezeny nebyly (Lantieri et al. 2006). V našem souboru ale mohla být tato skutečnost ovlivněna také tím, že u pacientů s krátkou formou je větší zastoupení mužů (78 %) než u pacientů s dlouhou formou (71 %). Byl totiž zaznamenán vliv pohlaví na frekvenci variantní alely, který byl již popsán u polymorfismu rs2435357, kdy byla variantní alela přítomna u 65 % mužů a pouze 56 % žen (Nunez-Torres et al. 2011). Naše studie ukazuje, že nejen u polymorfismů 5' haplobloku je vyšší zastoupení variantní alely u mužů (76 %) než u žen (60 %), ale tento trend byl zaznamenán také u rs1800861 ve 13. exonu a rs2565200 v 19. intronu, ač nesignifikantně. Frekvence rizikových alel těchto polymorfismů byla u mužů o 10 % vyšší. U variant haplobloku bylo ale riziko spojené s onemocněním výraznější (OR=8 u mužů vs. OR=4 u žen). Není tedy jasné, zda další objevená skutečnost, a to vyšší zastoupení variantních alel rs1800861 (47 %) a rs2565200 (45 %) u krátké formy oproti dlouhé formě (postupně 33 % a 29 %) nemá souvislost s rozdíly v zastoupení pohlaví mezi soubory. Riziko spojené s dlouhou formou HSCR bylo naopak spojeno s polymorfismy rs2472737 ve 14. intronu a rs2435355 v 3'UTR, kde bylo 2x vyšší v porovnání s krátkou formou. Obě dvě zjištění – tedy větší zastoupení variantních alel rs1800861 a rs2565200 u krátké formy a rs2472737 a rs2435355 u dlouhé formy – byla potvrzena u nositelů TTAA haplotypu.

#### 4.5.3 Shrnutí

Naše studie polymorfismů v *RET* proto-onkogenu si dala za cíl identifikovat varianty a haplotypy, které mohou být ve vazbě s Hirschsprungovou chorobou. Na základě našich analýz byly navrženy rizikové a protektivní markery, u nichž byl zkoumán nejen vliv na agresivitu onemocnění, ale také souvislost s pohlavím pacientů. Je známo, že HSCR postihuje 4x více chlapce a v souladu s touto skutečností byla naše zjištění, že markery nesoucí vysoké riziko HSCR jsou více zastoupeny u mužského pohlaví. Naopak překvapivě byly tyto rizikové varianty zaznamenány v méně agresivním fenotypu onemocnění. To ale dokládá, jak komplexní a multifaktoriální je genetika HSCR.



## 5. Závěr

Karcinomy štítné žlázy představují nejčastější onkologické onemocnění v endokrinologii. Disertační práce se zaměřuje na studium vztahu mezi genetickými změnami a jejich fenotypickými projevy u pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy (MTC) a Hirschsprungovou chorobou (HSCR). V patogenezi obou onemocnění hrají významnou roli mutace *RET* proto-onkogenu – v případě MTC aktivující, v případě HSCR inaktivující. Existují však i mutace s duálním charakterem a pacienti s HSCR jsou tak vystaveni zvýšenému riziku MTC.

Byly shromážděny rozsáhlé soubory pacientů a rodinných příslušníků a zpracována podrobná klinicko-patologická data, která byla korelována s nalezenými genetickými alteracemi. V našem souboru 490 pacientů s MTC a 381 jejich příbuzných v riziku onemocnění byla zárodečná mutace zjištěna u 60 pacientů a 73 rodinných příslušníků, z nichž naprostá většina podstoupila profylaktickou totální thyroidektomii. Dalších 114 členů rodin se známou kauzální mutací mohlo být díky negativnímu výsledku genetického vyšetření z klinického screeningu vyřazeno. Identifikace jednotlivých genetických změn v *RET* proto-onkogenu je podstatná nejen kvůli včasnému terapeutickému zásahu u rizikových osob ještě v presymptomatickém stadiu onemocnění, ale u pacientů pomůže zpřesnit diagnózu a odhadnout prognózu onemocnění. V rámci genetického testování rodin bylo popsáno několik unikátních kazuistik.

U sporadického MTC byly detekovány somatické mutace v nádorové tkáni, z nichž majoritní postavení měla mutace Met918Thr v 16. exonu, která byla asociována s horším klinickým výstupem a větší velikostí nádoru. Publikovali jsme prioritní záchyty násobných mutací. Identifikace somatické mutace přispívá ke zlepšení diagnostiky sporadických MTC, kdy je možné hereditární formu onemocnění již zcela vyvrátit. Významnou úlohu má znalost somatické mutace také při predikci vývoje onemocnění a také při terapii pomocí tyrozinkinázových inhibitorů, při které je znalost konkrétní mutace stěžejní pro výběr vhodného preparátu.

Systematický screening zárodečných mutací *RET* proto-onkogenu u pacientů s HSCR není celosvětově běžnou praxí. V některých centrech je zaveden rutinní screening 10. exonu

*RET* proto-onkogenu, ale často jen u pacientů s dlouhou formou HSCR, kde je riziko MTC vyšší. V našem souboru 214 pacientů s HSCR byla u 28 z nich zachycena zárodečná mutace, a to překvapivě často i v jiných pro MTC rizikových exonech, než pouze v 10. exonu. Proto preferujeme sekvenování všech pro MTC rizikových exonů *RET* proto-onkogenu u všech forem HSCR a u familiárních forem vyšetření rozšířit na celý *RET* proto-onkogen. U nově detekovaných mutací nemůžeme s jistotou tvrdit, že zvyšují riziko MTC, pacient ale může být na základě detekované mutace alespoň pod klinickým dohledem endokrinologa. Informace o kauzální mutaci v souvislosti s HSCR je také důležitá z hlediska genetického poradenství v rodinách s familiární formou HSCR a v budoucnu může být prospěšná ve spojitosti s preimplantační diagnostikou.

Protože vazebné studie i u pacientů bez zjištěné kauzální mutace ukazují, že *RET* proto-onkogen je majoritním genem v patogenezi obou onemocnění, byla v rámci disertační práce studována právě role polymorfismů jako modifikujících faktorů, podílejících se na vzniku a modulaci MTC a HSCR.

Výsledky studie polymorfismů u pacientů s MTC poukázaly na zjištění, že také polymorfismy v nekódujících oblastech *RET* proto-onkogenu, konkrétně v 1. intronu, mohou mít vliv na onemocnění. U polymorfismů rs1864410, rs2435357, rs2506004 (1. intron) a rs1800858 (2. exon) byl zaznamenán možný modifikující efekt v souvislosti s horším průběhem onemocnění – velikostí nádoru, přítomností lokálních metastáz lymfatických uzlin a recidivou onemocnění. Byl identifikován rizikový haplotyp TTAA tvořený minoritními alelami těchto 4 polymorfismů.

Při studiu polymorfismů u pacientů s HSCR byly identifikovány rizikové varianty v 1. intronu *RET* proto-onkogenu a určen rizikový haplotyp, který byl ve vazbě s HSCR. Byl také zkoumán vliv studovaných variant na agresivitu onemocnění a souvislost s pohlavím pacientů. HSCR postihuje 4x více chlapce a v souladu s touto skutečností byla naše zjištění, že markery nesoucí vysoké riziko HSCR jsou více zastoupeny u mužského pohlaví.

Naše pracoviště je jediným v republice, které zavedlo rutinní genetickou diagnostiku u pacientů s MTC a HSCR. V současné době se snažíme objasnit genetickou podstatu několika nevyřešených rodin s klinicky suspektní hereditární formou MTC, u kterých

nebyla mutace v celém *RET* proto-onkogenu zjištěna. V rámci prvotní studie bylo pomocí sekvenování nové generace a panelu s více než 90 geny souvisejících s predispozicí k rakovině identifikováno několik slibných kandidátních genů a konkrétních variant.

Výstupem disertační práce je 18 publikací mapujících naše studium genetických příčin u MTC a HSCR. Výsledky práce jsem prezentovala formou 22 přednášek a diskutovaných posterů na mezinárodních či domácích konferencích. Práce přispěla k získání nových vědeckých poznatků, k rozšíření molekulárně genetické diagnostiky MTC a HSCR v České republice a její výsledky se staly velice prospěšné jak lékařům, tak i pacientům a jejich příbuzným.

## Literatura

Amiel J, Emison ES, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R; Hirschsprung Disease Consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 2008; 45(1): 1-14.

Angrist M, Kauffman E, Slaugenhaupt SA, Matisse TC, Puffenberger EG, Washington SS, Lipson A, Cass DT, Reyna T, Weeks DE, et al. A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nat Genet* 1993; 4(4): 351-356.

Arighi E, Popsueva A, Degl'Innocenti D, Borrello MG, Carniti C, Perälä NM, Pierotti MA, Sariola H. Biological Effects of the Dual Phenotypic Janus Mutation of *ret* Cosegregating with Both Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 and Hirschsprung's Disease. *Mol Endocrinol* 2004; 18(4): 1004-1017.

Avantaggiato V, Dathan NA, Grieco M, Fabien N, Lazzaro D, Fusco A, Simeone A, Santoro M. Developmental expression of the *RET* proto-oncogene. *Cell Growth Differ* 1994; 5(3): 305-311.

Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, Heinze G, Niederle B, Kaserer K, Waldhäusl W, Vierhapper H. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the *RET* protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(11): 6232-6236.

Becker HD, Hohenberger W, Junginger T, Schlag PM. Chirurgická onkologie. Grada. 1. vydání. 2005.

Beldjord C, Desclaux-Arramond F, Raffin-Sanson M, Corvol JC, De Keyzer Y, Luton JP, Plouin PF, Bertagna X. The *RET* protooncogene in sporadic pheochromocytomas: frequent MEN 2-like mutations and new molecular defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(7): 2063-2068.

Bendlová B, Dvořáková Š, Václavíková E, Vlček P. Mnohočetná endokrinní neoplazie typ 2 - syndrom MEN 2A. *Klin Onkol* 2009; 22 Suppl: S28-S31.

Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grussendorf M, Raue F, Ritter MM, Höppner W. A new hot spot for mutations in the *ret* protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3): 770-4.

Boichard A, Croux L, Al Ghuzlan A, Broutin S, Dupuy C, Leboulleux S, Schlumberger M, Bidart JM, Lacroix L. Somatic *RAS* Mutations Occur in a Large Proportion of Sporadic *RET*-Negative Medullary Thyroid Carcinomas and Extend to a Previously Unidentified Exon. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(10): E2031–E2035.

Bolande RP. Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med* 1997; 17(1): 1-25.

Borun P, Jerzy S, Ziemnicka K, Kubaszewski L, Lipinski D, Plawski A. Absence of the *RET*+3:T allele in the MTC patients. *Hered Cancer Clin Pract* 2012; 10(1): 14. doi: 10.1186/1897-4287-10-14

Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA Jr, Marx SJ. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(12): 5658-5671.

Burzynski GM, Nolte IM, Bronda A, Bos KK, Osinga J, Plaza Menacho I, Twigt B, Maas S, Brooks AS, Verheij JB, Buys CH, Hofstra RM. Identifying candidate Hirschsprung disease-associated *RET* variants. *Am J Hum Genet* 2005; 76(5): 850-858.

Bütter A, Gagné J, Al-Jazaeri A, Emran MA, Deal C, St-Vil. Prophylactic thyroidectomy in pediatric carriers of multiple endocrine neoplasia type 2A or familial medullary thyroid carcinoma: mutation in C620 is associated with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2007; 42(1): 203-206.

Castellone MD, Carlomagno F, Salvatore G, Santoro M. Receptor tyrosine kinase inhibitors in thyroid cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22(6): 1023–1038.

Castro MR, Thomas BC, Richards ML, Zhang J, Morris JC. Multiple endocrine neoplasia type 2A due to an exon 8 (G533C) mutation in a large North American kindred. *Thyroid* 2013; 23(12): 1547-1552.

Cebrian A, Lesueur F, Martin S, Leyland J, Ahmed S, Luccarini C, Smith PL, Luben R, Whittaker J, Pharoah PD, Dunning AM, Ponder BA. Polymorphisms in the initiators of *RET* (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(11): 6268-6274.

Ceolin L, Siqueira DR, Ferreira CV, Romitti M, Maia SC, Leiria L, Crispim D, Ashton-Prolla P, Maia AL. Additive effect of *RET* polymorphisms on sporadic medullary thyroid carcinoma susceptibility and tumor aggressiveness. *Eur J Endocrinol* 2012; 166(5): 847-854.

Cerrato A, De Falco V, Santoro M. Molecular genetics of medullary thyroid carcinoma: the quest for novel therapeutic targets. *J Mol Endocrinol* 2009; 43(4): 143-155.

Ciampi R, Mian C, Fugazzola L, Cosci B, Romei C, Barollo S, Cirello V, Bottici V, Marconcini G, Pelizzo MR, Borrello MG, Basolo F, Ugolini C, Materazzi G, Pinchera A, Elisei R. Evidence of a Low Prevalence of *RAS* Mutations in a Large Medullary Thyroid Cancer Series. *Thyroid* 2013; 23(1): 50-57.

Colombo-Benkmann M, Li Z, Riemann B, Hengst K, Herbst H, Keuser R, Gross U, Rondot S, Raue F, Senninger N, Pützer BM, Frank-Raue K. Characterization of the *RET* protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(6): 811-816.

Crockett DK, Piccolo SR, Narus SP, Mitchell JA, Facelli JC. Computational Feature Selection and Classification of *RET* Phenotypic Severity. *J Data Mining in Genom Proteomics* 2010; 1: 103. doi:10.4172/2153-0602.1000103

Crockett DK, Piccolo SR, Ridge PG, Margraf RL, Lyon E, Williams MS, Mitchell JA. Predicting Phenotypic Severity of Uncertain Gene Variants in the *RET* Prot-Oncogene. *PLoS One* 2011; 6(3): e18380. doi: 10.1371/journal.pone.0018380

Da Silva AM, Maciel RM, Da Silva MR, Toledo SR, De Carvalho MB, Cerutti JM. A novel germ-line point mutation in *RET* exon 8 (Gly(533)Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(11): 5438–5443.

de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. *RET* as a Diagnostic and Therapeutic Target in Sporadic and Hereditary Endocrine Tumors. *Endocrine Rev* 2006; 27(5): 535-560.

Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA Jr. Mutations in the *RET* proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2(7): 851-856.

Dvorakova S, Dvorakova K, Malikova M, Skaba R, Vlcek P, Bendlova B. A novel Czech kindred with familial medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2005; 40(6): e1–e6.

Dvořáková Š, Václavíková E, Škába R, Kavalcová L, Bendlová B. Hirschsprungova choroba a její genetické příčiny. *Čes-slov Pediat* 2013; 68(3), 167-176.

Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, Barale R, Pacini F, Pinchera A. *RET* exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(7): 3579-3584.

Elisei R, Romei C, Cosci B, Agate L, Bottici V, Molinaro E, Sculli M, Miccoli P, Basolo F, Grasso L, Pacini F, Pinchera A. *RET* genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(12): 4725-4729.

Emison ES, Garcia-Barcelo M, Grice EA, Lantieri F, Amiel J, Burzynski G, Fernandez RM, Hao L, Kashuk C, West K, Miao X, Tam PK, Griseri P, Ceccherini I, Pelet A, Jannot AS, de

Pontual L, Henrion-Caude A, Lyonnet S, Verheij JB, Hofstra RM, Antinolo G, Borrego S, McCallion AS, Chakravarti A. Differential contributions of rare and common, coding and noncoding *RET* mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet* 2010; 87(1): 60-74.

Eric Z, Hoffmann MM, Sullivan M, Franke G, Peczkowska M, Harsch I, Schott M, Gabbert HE, Valimaki M, Preuss SF, Hasse-Lazar K, Waligorski D, Robledo M, Januszewicz A, Eng C, Neumann HP. Pathogenicity of DNA Variants and Double Mutations in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 and Von Hippel-Lindau Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(1): 308-313.

Fialkowski EA, Moley JF. Current approaches to medullary thyroid carcinoma, sporadic and familial. *J Surg Oncol* 2006; 94(8): 737-747.

Fitze G, Cramer J, Ziegler A, Schierz M, Schreiber M, Kuhlisch E, Roesner D, Schackert HK. Association between c135G/A genotype and *RET* proto-oncogene germline mutations and phenotype of Hirschsprung's disease. *Lancet* 2002; 359(9313): 1200-1205.

Garcia-Barcelo M, Ganster RW, Lui VC, Leon TY, So MT, Lau AM, Fu M, Sham MH, Knight J, Zannini MS, Sham PC, Tam PK. *TTF-1* and *RET* promoter SNPs: regulation of *RET* transcription in Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14(2): 191-204.

Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H, Eng C. Over-representation of a germline *RET* sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic *RET* codon 918 mutation. *Oncogene* 1999; 18(6): 1369–1373.

Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Bocciardi R, Hofstra R, Ravazzolo R, Devoto M, Romeo G, Ceccherini I. A single-nucleotide polymorphic variant of the *RET* proto-oncogene is underrepresented in sporadic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 2000; 8(9): 721–724.



Griseri P, Lantieri F, Puppo F, Bachetti T, Di Duca M, Ravazzolo R, Ceccherini I. A common variant located in the 3'UTR of the *RET* gene is associated with protection from Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 2007; 28(2): 168-176.

Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(6): 466-479.

Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Höppener JW, van Amstel HK, Romeo G. A mutation in the *RET* proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994; 367(6461): 375-376.

Holschneider AM, Puri P. Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 2nd Edition. Amsterdam. *Harwood Academic Publishers* 2000.

Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. *RET* and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett* 2004; 204(2): 197-211.

Ishii K, Doi T, Inoue K, Okawada M, Lane GJ, Yamataka A, Akawaza C. Correlation between multiple *RET* mutations and severity of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2013; 29(2): 157-163.

Kessmann J: Hirschsprung's Disease: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* 2006; 74(8): 1319-1322.

Kjaer S, Kurokawa K, Perrinjaquet M, Abrescia C, Ibáñez CF. Self-association of the transmembrane domain of RET underlies oncogenic activation by MEN2A mutations. *Oncogene* 2006; 25(53): 7086-7095.

Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M, Wells SA Jr. Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009; 19(6): 565-612.

Lantieri F, Griseri P, Puppo F, Campus R, Martucciello G, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I. Haplotypes of the Human *RET* Proto-oncogene Associated with Hirschsprung Disease in the Italian Population Derive from a Single Ancestral Combination of Alleles. *Ann Hum Genet* 2006; 70(Pt 1): 12-26.

Lantieri F, Caroli F, Ceccherini I, Griseri P. The involvement of the *RET* variant G691S in medullary thyroid carcinoma enlightened by a meta-analysis study. *Int J Cancer* 2013; 132(12): 2808-2819.

Lesueur F, Corbex M, McKay JD, Lima J, Soares P, Griseri P, Burgess J, Ceccherini I, Landolfi S, Papotti M, Amorim A, Goldgar DE, Romeo G. Specific haplotypes of the *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma. *J Med Genet* 2002; 39(4): 260-265.

Lesueur F, Cebrian A, Robledo M, Niccoli-Sire P, Svensson KA, Pinson S, Leyland J, Whittaker J, Pharoah PD, Ponder BA. Polymorphisms in *RET* and its coreceptors and ligands as genetic modifiers of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Cancer Res* 2006; 66(2): 1177-1180.

Liu X, Vega QC, Decker RA, Pandey A, Worby CA, Dixon JE. Oncogenic *RET* receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem* 1996; 271(10): 5309-5312.

Lodish MB, Stratakis CA. *RET* oncogene in MEN2, MEN2B, MTC and other forms of thyroid cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8(4): 625-632.

Lyonnet S, Bolino A, Pelet A, Abel L, Nihoul-Fekete C, Briard ML, Mok-Siu V, Kaariainen H, Martucciello G, Lerone M, Puliti A, Luo Y, Weissenbach J, Devoto M, Munnich A, Romeo G. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet* 1993; 4(4): 346-350.

Machens A, Dralle H. Familial prevalence and age of *RET* germline mutations: implications for screening. *Clinical Endocrinology* 2008; 69(1), 81-87.

Machens A, Dralle H. Multiple endocrine neoplasia type 2: achievements and current challenges. *Clinics* 2012; 67(S1): 113-118.

Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson AL, Delbridge L, Eng C, Robinson BG. Somatic mutations in the *RET* proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44(3): 249–257.

Martucciello G, Biccocchi MP, Doderio P, Lerone M, Cirillo MS, Puliti A, Gimelli G, Romeo G, Jasonni V. Total colonic aganglionosis associated with interstitial deletion of the long arm of chromosome 10. *Pediatr Surg Int* 1992; 7(4): 308-310.

Mathew CG, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Carter C, Liou GI, Fong SL, Bridges CD, Haak H, Kruseman AC, Schifter S, Hansen HH, Telenius H, Telenius-Berg M, Ponder BA. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature* 1987; 328(6130): 527-528.

Miao X, Leon TY, Ngan ES, So MT, Yuan ZW, Lui VC, Chen Y, Wong KK, Tam PK, Garcia-Barceló M. Reduced RET expression in gut tissue of individuals carrying risk alleles of Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 2010; 19(8): 1461-1467.

Mihál V, Michálková K, Malý T, Flodr P, Karásková E. Hirschsprungova choroba jako příčina chronické zácpy. *Pediatr pro Praxi* 2009; 10(4): 272-273.

Mise N, Drosten M, Racek T, Tannapfel A, Pützer BM. Evaluation of potential mechanisms underlying genotype-phenotype correlations in multiple endocrine neoplasia type 2. *Oncogene* 2006; 25(50): 6637-47.

Moore SW. The contribution of associated congenital anomalies in understanding Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(4): 305-315.

Moore SW, Zaahl M. The Hirschsprung's–multiple endocrine neoplasia connection. *Clinics* 2012; 67(S1): 63-67.

Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Domingues R, Santos JR, Cid MO, Bugalho MJ, Leite V. Correlation of *RET* somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 2009; 100(11): 1777–1783.

Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V. High Prevalence of *RAS* Mutations in *RET*-Negative Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(5): E863–E868.

Mulligan LM, Eng C, Attie T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ, Robinson BG, Frilling A, Verellen-Dumoulin C, Safar A, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the *RET* proto-oncogene. *Hum Mol Genet* 1994; 3(12): 2163-2167.

Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L ,et al. Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363(6428): 458-460.

Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. Characterization of *RET* proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for *RET*. *Oncogene* 1995; 11(10): 2039-2045.

Nunez-Torres R, Fernandez RM, Acosta MJ, Enguix-Riego Mdel V, Marba M, Carlos de Agustin J, Castano L, Antinolo G, Borrego S. Comprehensive analysis of *RET* common and rare variants in a series of Spanish Hirschsprung patients confirms a synergistic effect of both kinds of events. *BMC Med Genet* 2011; 12: 138. doi: 10.1186/1471-2350-12-138

Oczko-Wojciechowska M, Pfeifer A, Rusinek D, Pawlaczek A, Zebracka-Gala J, Kowalska M, Kowal M, Swierniak M, Krajewska J, Gawlik T, Chmielik E, Czarniecka A, Szpak-Ulczoek S, Jarzab B. The prevalence of somatic *RAS* mutations in medullary thyroid cancer – a Polish population study. *Endokrynol Pol* 2015; 66(2): 121-125.

Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the *c-ret* proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 1993; 119(4): 1005-1017.

Pakarinen MP, Rintala RJ, Koivusalo A, Heikkinen M, Lindahl H, Pukkala E. Increased incidence of medullary thyroid carcinoma in patients treated for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2005; 40(10): 1532-1534.

Pan ZW, Luo CF, Liu ZJ, Li JC. *RET* 3'UTR polymorphisms and its protective role in Hirschsprung disease in southeastern Chinese. *J Pediatr Surg* 2012; 47(9): 1699-1705.

Pasini A, Geneste O, Legrand P, Schlumberger M, Rossel M, Fournier L, Rudkin BB, Schuffenecker I, Lenoir GM, Billaud M. Oncogenic activation of *RET* by two distinct FMTC mutations affecting the tyrosine kinase domain. *Oncogene* 1997; 15(4): 393-402.

Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM, Ceccherini I, Patrone G, Priolo M, Buys CH, Romeo G. The physical map of the human *RET* proto-oncogene. *Oncogene* 1995; 11(9): 1737-1743.

Peppas M, Boutati E, Kamakari S, Pikounis V, Peros G, Panayiotides IG, Economopoulos T, Raptis SA, Hadjidakis D.. Multiple endocrine neoplasia type 2A in two families with the familial medullary thyroid carcinoma associated G533C mutation of the *RET* proto-oncogene. *Eur J Endocrinol* 2008; 159(6): 767-771.

Plaza Menacho I, Koster R, van der Sloot AM, Quax WJ., Osinga J, van der Sluis T, Hollema H, Burzynski GM, Gimm O, Buys CH, Eggen BJ, Hofstra RM. *RET*-familial medullary thyroid carcinoma mutants Y791F and S891A activate a Src/JAK/STAT3 pathway, independent of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Cancer Research* 2005; 65(5): 1729-1737.

Plaza-Menacho I, Mologni L, Sala E, Gambacorti-Passerini C, Magee AI, Links TP, Hofstra RM, Barford D, Isacke CM. Sorafenib functions to potently suppress RET tyrosine kinase activity by direct enzymatic inhibition and promoting RET lysosomal degradation independent of proteasomal targeting. *J Biol Chem* 2007; 282(40): 29230-29240.

Prazeres H, Couto JP, Rodrigues F, Vinagre J, Torres J, Trovisco V, Martins TC, Sobrinho-Simoes M, Soares P. In vitro transforming potential, intracellular signaling properties, and sensitivity to a kinase inhibitor (sorafenib) of *RET* proto-oncogene variants Glu511Lys, Ser649Leu, and Arg886Trp. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18(4): 401-412.

Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics* 2012; 67(S1): 69-75.

Robledo M, Gil L, Pollan M, Cebrian A, Ruiz S, Azanedo M, Benitez J, Menarguez J, Rojas JM. Polymorphisms G691S/S904S of *RET* as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res* 2003; 63(8): 1814–1817.

Ruiz A, Antinolo G, Fernandez RM, Eng C, Marcos I, Borrego S. Germline sequence variant S836S in the *RET* proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55(3): 399–402.

Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Milne RL, Moya CM, Cebrián A, Letón R, Cascón A, Mercadillo F, Landa I, Borrego S, Pérez de Nanclares G, Alvarez-Escolá C, Díaz-Pérez JA, Carracedo A, Urioste M, González-Neira A, Benítez J, Santisteban P, Dopazo J, Ponder BA, Robledo M; Medullary Thyroid Carcinoma Clinical Group. Association. Study of 69 genes in the *ret* pathway identifies low-penetrance loci in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67(19): 9561-9567.

Ruttenstock E, Puri P. A meta-analysis of clinical outcome in patients with total intestinal aganglionosis. *Pediatr Surg Int* 2009; 25(10): 833-839.

Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco A, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH. Activation of *RET* as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 1995; 267(5196): 381-383.

Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Fusco A. Dysfunction of the RET receptor in human cancer. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(23): 2954-2964.

Santarpia L, Ye L, Gagel RF. Beyond RET: potential therapeutic approaches for advanced and metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Intern Med* 2009; 266(1): 99–113.

Seri M, Yin L, Barone V, Bolino A, Celli I, Bocciardi R, Pasini B, Ceccherini I, Lerone M, Kristoffersson U, Larsson LT, Casasa JM, Cass DT, Abramowicz MJ, Vanderwinden JM,

Kravcenkiene I, Baric I, Silengo M, Martucciello G, Romeo G. Frequency of *RET* mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 1997; 9(3): 243-9.

Shimotake T, Iwai N, Inoue K, Kimura T, Ichikawa D, Abe T, Inazawa J. Germline mutation of the *RET* proto-oncogene in children with total intestinal aganglionosis. *J Pediatr Surg* 1997; 32(3): 498-500.

Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor RET. *Nature* 1994; 367(6461): 380-383.

Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDermid H, Myers S, Kidd JR, Jackson CE, Duncan AM, Ferrer LA, Brasch L, et al. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* 1987; 328(6130): 528-530.

Siqueira DR, Romitti M, da Rocha AP, Ceolin L, Meotti C, Estivalet A, Punaes MK, Maia AL. The *RET* polymorphic allele S836S is associated with early metastatic disease in patients with hereditary or sporadic medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(4): 953-963.

Skinner MA, Moley JA, Dilley WG, Owzar K, Debenedetti MK, Wells SA Jr. Prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med* 2005; 353(11): 1105-1113.

So MT, Leon TY, Cheng G, Tang CS, Miao XP, Cornes BK, Diem NN, Cui L, Ngan ES, Lui VC, Wu XZ, Wang B, Wang H, Yuan ZW, Huang LM, Li L, Xia H, Zhu D, Liu J, Nguyen TL, Chan IH, Chung PH, Liu XL, Zhang R, Wong KK, Sham PC, Cherny SS, Tam PK, Garcia-Barcelo MM. *RET* mutational spectrum in Hirschsprung disease: evaluation of 601 Chinese patients. *PLoS One* 2011; 6(12): e28986. doi: 10.1371/journal.pone.0028986

Solari V, Ennis S, Yoneda A, Wong L., Messineo A., Hollwarth ME, Green A, Puri P. Mutation analysis of the *RET* gene in total intestinal aganglionosis by wave DNA fragment analysis system. *J Pediatr Surg* 2003; 38(3): 497-501.

Sribudiani Y, Metzger M, Osinga J, Rey A, Burns AJ, Thapar N, Hofstra RM. Variants in *RET* associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology* 2011; 140(2): 572-582.e2.

Sromek M, Czetwertynska M, Skasko E, Zielinska J, Czapczak D, Steffen J. The frequency of selected polymorphic variants of the *RET* gene in patients with medullary thyroid carcinoma and in the general population of central Poland. *Endocr Pathol* 2010; 21(3): 178-185.

Škába R. Diferenciální diagnostika a možnosti chirurgického léčení chronické zácpy v dětském věku. *Pediatr pro Praxi* 2003; 4(1): 6-8.

Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the *ret* proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 1988; 3(5): 571-578.

Takahashi M, Iwashita T, Santoro M, Lyonnet S, Lenoir GM, Billaud M. Co-segregation of MEN2 and Hirschsprung's disease: the same mutation of *RET* with both gain and loss-of-function? *Hum Mutat* 1999; 13(4): 331-336.

Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, *RET*, by DNA rearrangement. *Cell* 1985; 42(2): 581-588.

Toledo RA, Hatakana R, Lourenço DM Jr, Lindsey SC, Camacho CP, Almeida M, Lima JV Jr, Sekiya T, Garralda E, Naslavsky MS, Yamamoto GL, Lazar M, Meirelles O, Sobreira TJ, Lebrao ML, Duarte YA, Blangero J, Zatz M, Cerutti JM, Maciel RM, Toledo SP. Comprehensive assessment of the disputed *RET* Y791F variant shows no association with medullary thyroid carcinoma susceptibility. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22(1): 65-76.

Tomiyama H, Shimotake T, Ono S, Kimura O, Tokiwa K, Iwai N. Relationship between the type of *RET/GDNF/NTN* or *SOX10* gene mutations and long-term results after surgery for total colonic aganglionosis with small bowel involvement. *J Pediatr Surg* 2001; 36(11): 1685-1688.



Tou J, Wang L, Liu L, Wang Y, Zhong R, Duan S, Liu W, Xiong Q, Gu Q, Yang H, Li H. Genetic variants in *RET* and risk of Hirschsprung's disease in Southeastern Chinese: a haplotype-based analysis. *BMC Med Genet* 2011; 12: 32. doi: 10.1186/1471-2350-12-32

Václavíková E. *RET* proto-onkogen v patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. 2006.

Vaclavikova E, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, Dvorakova K, Vlcek P, Skaba R, Zelinka T, Bendlova B. *RET* mutation - Tyr791Phe - the genetic cause of different diseases derived from neural crest. *Endocrine* 2009; 36(3): 419-424.

Vierhapper H, Bieglmayer C, Heinze G, Baumgartner-Parzer S. Frequency of *RET* proto-oncogene mutations in patients with normal and with moderately elevated pentagastrin-stimulated serum concentrations of calcitonin. *Thyroid* 2004; 14(8): 580-583.

Vlček P, Neumann J. Karcinom štítné žlázy. Pooperační sledování nemocných. 1. vydání. Praha: Maxdorf 2002: 220. ISBN: 80-85912-50-3.

Vlček P. Medulární karcinom štítné žlázy – diagnostické a léčebné možnosti. *Onkologie* 2011; 5(6): 336-339.

Wallace AS, Anderson RB. Genetic interactions and modifier genes in Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17(45): 4937-4944.

Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, Wloch J, Lisowska K, Krassowski J, Scieglinska D, Fiszler-Kierzkowska A, Lange D, Kula D, Zeman M, Roskozs J, Kukulska A, Krawczyk Z, Jarzab B. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(5): 1374-1380.

## Seznam zkratek

ART	artemin
ATP	adenosintrifosfát (adenosin triphosphate)
CCH	hyperplázie C-buněk (C-cell hyperplasia)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FMTC	familiární medulární karcinom štítné žlázy (familial MTC)
FNAB	aspirační biopsie tenkou jehlou (fine needle aspiration biopsy)
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFR $\alpha$	GDNF family receptor $\alpha$
HSCR	Hirschsprungova choroba
LCA	dlouhá forma střevní aganglionózy (long colonic aganglionosis)
L-HSCR	dlouhá forma Hirschsprungovy choroby
MEN 2A	mnohočetná endokrinní neoplázie typu 2A
MEN 2B	mnohočetná endokrinní neoplázie typu 2B
MTC	medulární karcinom štítné žlázy (medullary thyroid carcinoma)
NTN	neurturin
NTSBA	téměř totální forma aganglionózy tenkého střeva (nearly total small bowel aganglionosis)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PSP	persefin
RET	REarranged during Transfection
RS-HSCR	rekto-sigmoideální forma Hirschsprungovy choroby
S-HSCR	krátká forma Hirschsprungovy choroby
TCA	totální aganglionóza tlustého střeva (total colonic aganglionosis)
TIA	totální intestinální aganglionóza (total intestinal aganglionosis)
TKI	tyrozinkinázový inhibitor
TNM	tumor-uzlina-metastáza (tumor-node-metastasis)
TTE	totální thyreoidektomie
UKS	ultrakrátký segment Hirschsprungovy choroby
UTR	nepřekládaná oblast (untranslated region)

## Seznam obrázků

Obr. 1	Schéma RET proteinu .....	9
Obr. 2	Schéma aktivace RET tyrozinkinázového receptoru za normálních podmínek – vazba ligandu na koreceptor a následná dimerizace receptoru .....	10
Obr. 3	Aktivace aberantního RET tyrozinkinázového receptoru s mutací a) v extracelulární doméně a b) v intracelulární doméně .....	11
Obr. 4	Štítná žláza .....	12
Obr. 5	Vývoj hrubé incidence karcinomu štítné žlázy u českých pacientů mezi lety 1977-2011 ve srovnání celé populace s populací mužů a žen .....	13
Obr. 6	Věková struktura pacientů s karcinomem štítné žlázy v období let 1977–2011 .....	13
Obr. 7	Srovnání hrubé incidence karcinomu štítné žlázy v České republice s ostatními zeměmi světa .....	14
Obr. 8	Buňky štítné žlázy .....	15
Obr. 9	Aspirační biopsie tenkou jehlou .....	17
Obr. 10	Normální nález C-buněk při imunohistochemickém barvení .....	17
Obr. 11	Scintigrafie <sup>123</sup> I-MIGB u pacienta s feochromocytomem .....	18
Obr. 12	Schéma <i>RET</i> proto-onkogenu s lokalizací zárodečných mutací specifických pro MTC .....	20
Obr. 13	Nejčastější zárodečné <i>RET</i> mutace ve vztahu k mechanismu aktivace .....	21
Obr. 14	Působení inhibitorů na signální dráhy .....	24
Obr. 15	Schéma diagnostiky MTC .....	25
Obr. 16	Průřez střevem s vyznačením submukózního a myenterického plexu .....	28
Obr. 17	Dilatované střevo nad aganglionárním úsekem .....	30
Obr. 18	Signalizace u HSCR .....	35

## Seznam tabulek

Tab. 1	Klasifikace neurokristopatií .....	8
Tab. 2	Klinické projevy familiárních forem MTC .....	16
Tab. 3	Klasifikace zárodečných mutací a doporučení .....	22
Tab. 4	Syndromická a nesyndromická HSCR .....	32
Tab. 5	Protokol pro amplifikaci exonů <i>RET</i> proto-onkogenu .....	40
Tab. 6	Podmínky pro amplifikaci exonů <i>RET</i> proto-onkogenu .....	40
Tab. 7	Sekvence primerů na amplifikaci exonů <i>RET</i> proto-onkogenu .....	41
Tab. 8	Protokol sekvenační reakce .....	42
Tab. 9	Sekvence primerů na sekvenaci exonů <i>RET</i> proto-onkogenu .....	42
Tab. 10	Sekvence primerů pro Long Range amplifikaci úseků <i>RET</i> proto-onkogenu	44
Tab. 11	Protokol genotypizační analýzy pomocí TaqMan Assay .....	45
Tab. 12	Záchyt zárodečných mutací <i>RET</i> proto-onkogenu u českých pacientů s MTC a výsledky genetické analýzy u rodinných příslušníků .....	47
Tab. 13	Zárodečné mutace v <i>RET</i> proto-onkogenu detekované v českých rodinách s MTC .....	48
Tab. 14	Pacienti s MEN 2B se zárodečnou mutací Met918Thr v 16. exonu <i>RET</i> proto-onkogenu .....	48
Tab. 15	Somatické mutace detekované u českých pacientů se sporadickým MTC .....	57
Tab. 16	Alelická distribuce <i>RET</i> variant u pacientů se sporadickým MTC a u kontrol	61
Tab. 17	Klinicko-patologická data pacientů s recidivou sporadického MTC .....	62
Tab. 18	Alelická distribuce studovaných variant v <i>RET</i> proto-onkogenu u pacientů se sporadickým MTC s TNM stadiem T1 vs. T2, T3 a T4 a N0 vs. N1 .....	63
Tab. 19	Alelická distribuce studovaných variant v <i>RET</i> proto-onkogenu u pacientů se sporadickým MTC s recidivou v porovnání s pacienty bez recidivy a u pacientů s lokálními metastázami vs. bez lokálních metastáz .....	64
Tab. 20	Distribuce haplotypů a diplotypů haplobloku polymorfismů v 1. intronu a 2. exonu u pacientů se sporadickým MTC s recidivou vs. bez recidivy .....	64
Tab. 21	Záchyt zárodečných mutací v <i>RET</i> proto-onkogenu u pacientů s HSCR .....	70
Tab. 22	Záchyt zárodečných mutací v <i>RET</i> proto-onkogenu dle fenotypu onemocnění .....	70
Tab. 23	In silico analýzy zárodečných mutací v <i>RET</i> proto-onkogenu detekovaných u pacientů s HSCR .....	71
Tab. 24	Alelická distribuce studovaných variant v <i>RET</i> proto-onkogenu u pacientů s HSCR a u kontrol .....	77

## Publikační a prezentační aktivita

### Publikační činnost

1. Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, Bendlova B. Exon 5 of the *RET* proto-oncogene: A newly detected risk exon for familial medullary thyroid carcinoma, a novel germ-line mutation Gly321Arg. *J Endocrinol Invest* 2005; 28(10): 905-909. (IF – 1,552)
2. Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, Novak Z, Bendlova B. New Multiple Somatic Mutations in the *RET* proto-oncogene Associated with a Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2006; 16(3): 311-316. (IF – 3,843)
3. Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Ryska A, Cap J, Vlcek P, Duskova J, Kodetova D, Holub V, Novak Z, Bendlova B. Double Germline Mutations in the *RET* Proto-oncogene in MEN 2A and MEN 2B Kindreds. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2006; 114(4): 192-196. (IF – 1,760)
4. Skaba R, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Vlcek P, Frantlova M, Bendlova B. The risk of medullary thyroid carcinoma in patients with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(12): 991-995. (IF – 1,061)
5. Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, Vlček P, Škába R. Nádory štítné žlázy a Hirschsprungova choroba: Desetileté zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou *RET* proto-onkogenu. *Vnitř Lék* 2006; 52(10): 926-934.
6. Holub V, Dvořáková S, **Václavíková E**, Ryška A, Čáp J, Vlček P, Dušková J, Kodetová D, Novák Z, Bendlová B. Význam molekulárně genetického vyšetření u syndromu mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2A na příkladu jedné rodiny o třech generacích. *Prakt lék* 2007; 87(3): 157-159.
7. Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, Ryska A, Laco J, Cap J, Kodetova J, Kodet R, Krskova L, Vlcek P, Astl J, Vesely D, Bendlova B. Somatic mutations in the *RET* proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 284(1-2): 21-27. (IF – 4,241)

8. Maruna P, Duskova J, Limanova Z, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Bendlova B. Mixed medullary and follicular cell carcinoma of the thyroid in a 71-year-old man with history of malignant melanoma. *Med Sci Monit* 2008; 14(4): CS31-36. (IF – 1,216)
9. Ryska A, Cap J, **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Bendlova B, Hovorkova E, Kohout A. Paraganglioma-like medullary thyroid carcinoma: fine needle aspiration cytology features with histological correlation. *Cytopathology* 2009; 20(3): 188-194. (IF – 1,470)
10. Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Vlček P. Mnohočetná endokrinní neoplazie typ 2 - syndrom MEN 2A. *Klin Onkol* 2009; 22 Suppl: S28-S31.
11. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, Dvorakova K, Vlcek P, Skaba R, Zelinka T, Bendlova B. *RET* mutation - Tyr791Phe - the genetic cause of different diseases derived from neural crest. *Endocrine* 2009; 36(3): 419-424. (IF – 3,527)
12. Sykorova V, Dvorakova S, Ryska A, Vcelak J, **Vaclavikova E**, Laco J, Kodetova D, Kodet R, Cibula A, Duskova J, Hlobilkova A, Astl J, Vesely D, Betka J, Hoch J, Smutny S, Cap J, Vlcek P, Novak Z, Bendlova B. *BRAFV600E* Mutation in the Pathogenesis of a Large Series of Papillary Thyroid Carcinoma in Czech Republic. *J Endocrinol Invest* 2010; 33(5): 318-324. (IF – 1,552)
13. Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, Hálková T, **Václavíková E**. Genetika nádorů štítné žlázy a jejich molekulárně cílená léčba. *Onkologie* 2011; 5(6): 325-328.
14. Benej M, Bendlova B, **Vaclavikova E**, Poturnajova M. Establishing high resolution melting analysis: method validation and evaluation for *c-RET* proto-oncogene mutation screening. *Clin Chem Lab Med* 2011; 50(1): 51-60. (IF – 2,955)
15. **Vaclavikova E**, Kavalcova L, Skaba R, Dvorakova S, Macokova P, Rouskova B, Bendlova B. Hirschsprung's disease and medullary thyroid carcinoma: 15-year experience with molecular genetic screening of the *RET* proto-oncogene. *Pediatr Surg Int* 2012; 28(2): 123-128. (IF – 1,061)

16. Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, **Václavíková E**, Hálková T. Nádory štítné žlázy – molekulárně genetické příčiny a možnosti cílené léčby. *Čas lék čes* 2012; 151(3): 123-127.
17. Laco J, Kamaradova K, Vitkova P, Sehnalkova E, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Kaspirkova J, Skalova A, Ryska A. Cribriform adenocarcinoma of minor salivary glands may express galectin-3, cytokeratin 19, and HBME-1 and contains polymorphisms of *RET* and *H-RAS* proto-oncogenes. *Virchows Arch* 2012; 461(5): 531-540. (IF – 2,560)
18. Dvořáková Š, **Václavíková E**, Škába R, Kavalcová L, Bendlová B. Hirschsprungova choroba a její genetické příčiny. *Čes-slov Pediat* 2013; 68(3): 167-176.
19. Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, Hálková T, Bendlová B. Hereditární karcinomy štítné žlázy a jejich molekulární diagnostika. *Česk Patol* 2014; 50(2): 81-86.
20. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Skaba R, Pos L, Sykorova V, Halkova T, Vcelak J, Bendlova B. *RET* variants and haplotype analysis in a cohort of Czech patients with Hirschsprung disease. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e98957. doi:10.1371/journal.pone.0098957 (IF – 3,534)
21. Sykorova V, Dvorakova S, Vcelak J, **Vaclavikova E**, Halkova T, Kodetova D, Lastuvka P, Betka J, Vlcek P, Reboun M, Katra R, Bendlova B. Search for new genetic biomarkers in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas using next generation sequencing. *Anticancer Res* 2015; 35(4): 2029-2036. (IF – 1,872)

### **Prezentační činnost**

1. **Václavíková E**, Dvořáková Š, Dušková J, Vlček P, Bendlová B. Nová mutace v 5. exonu (GLY321ARG) *RET* proto-onkogenu detekovaná u rodiny s familiárním karcinomem štítné žlázy. XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 20.-22.10.2005. *Sborník abstrakt*: str. 129 (přednáška)

2. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, Bendlova B. A Novel Germ-line Mutation Gly321Arg in the Exon 5 of the *RET* Proto-oncogene Detected in a Family with Familial Medullary Thyroid Carcinoma. 8th European Congress of Endocrinology, Glasgow, UK, 1-5 April 2006. *Endocrine Abstracts* 2006; 11: P506 (prezentovaný poster)
3. **Václavíková E**, Dvořáková Š, Vlček P, Škába R, Bendlová B. *RET* proto-onkogen v patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc, 7.-9.12.2006. *Sborník abstrakt*: str. 33 (přednáška)
4. **Václavíková E**. *RET* proto-onkogen v patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby. Seminář pro postgraduální studenty "Vybrané problémy endokrinologie a metabolismu". Endokrinologický ústav, Praha, 29.1.2007 (přednáška)
5. **Václavíková E**, Dvořáková Š, Vlček P, Škába R, Bendlová B. *RET* proto-onkogen v patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby. Konference DNA analýza IV, Praha, 24.-25.5.2007 (přednáška)
6. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Vlcek P, Skaba R, Bilek R, Bendlova B. *RET* mutation - Tyr791Phe - the genetic cause of different diseases derived from neural crest. 9th European Congress of Endocrinology, Budapest, Hungary, 28 April - 2 May 2007. *Endocrine Abstracts* 2007; 14: OC3.4 (přednáška)
7. **Václavíková E**, Dvořáková Š, Bílek R, Vlček P, Škába R a Bendlová B. Mutace v *RET* proto-onkogenu (Tyr791Phe) jako příčina různých onemocnění odvozených od neurální lišty. XXX. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Špindlerův Mlýn, 4.-6.10.2007. *Sborník abstrakt*: str. 27 (přednáška)
8. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Strakova V, Vlcek P, Bendlova B. Screening of *RET* proto-oncogene polymorphisms in patients with medullary thyroid carcinoma. 33rd Annual Meeting of the European Thyroid Association, Thessaloniki-Chalkidiki, Greece, 20-24 September 2008. *Hormones* 2008; 7 (suppl. 1): P122: 95 (prezentovaný poster)



9. **Václavíková E**, Dvořáková Š, Sýkorová V, Vlček P, Bendlová B. Screening polymorfismů *RET* proto-onkogenu u pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy. XXXI. Endokrinologické dni, Štrbské Pleso, 2.-4.10.2008. *Sborník abstrakt*; A42: 102 (prezentovaný poster)
10. **Vaclavikova E**, Sykorova V, Dvorakova S, Dvorakova K, Holub V, Novak Z, Vlcek P, Bendlova B. Molecular genetic analysis of medullary and papillary thyroid carcinomas: unusual cases. 34th Annual meeting of the European Thyroid Association (ETA), Lisbon, Portugal, 5-9 September 2009. *Acta Med Port* 2009; 22 (1): P080: 75 (prezentovaný poster)
11. **Václavíková E**, Sýkorová V, Dvořáková Š, Dvořáková K, Novák Z, Holub V, Vlček P, Kodetová D, Bendlová B. Molekulárně genetická analýza medulárního a papilárního karcinomu štítné žlázy: neobvyklé případy. XXXII. Endokrinologické dny, Český Krumlov, 24.-26. září 2009. *Sborník abstrakt*: str. 130-131 (prezentovaný poster)
12. **Václavíková E**. Genetické pozadí nádorů štítné žlázy: Medulární karcinom štítné žlázy. Seminář pro postgraduální studenty "Vybrané problémy endokrinologie a metabolismu". Endokrinologický ústav, Praha, 19.4.2010 (přednáška)
13. **Vaclavikova E**, Sykorova V, Dvorakova S, Vlcek P, Bendlova B. Intronic polymorphism IVS14-24G/A of the *RET* proto-oncogene seems to be protective for sporadic medullary thyroid carcinoma development. 12th European Congress of Endocrinology, Prague, 24-28 April 2010. *Endocrine Abstracts* 2010; 22: P430 (prezentovaný poster)
14. **Vaclavikova E**, Skaba R, Kavalcova L, Dvorakova S, Bendlova B. Hirschsprung's disease and medullary thyroid carcinoma – 15-year experience with molecular genetic screening of the *RET* proto-oncogene. 24th International Symposium on Pediatric Surgical Research, Graz, Austria, 8-10 September 2011 (přednáška prezentovaná dr. Kavalcovou - oceněno 2. místem Aesculab Prize)

15. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Vlcek P, Bendlova B. Screening of the *RET* proto-oncogene in Czech patients with medullary thyroid carcinoma. 35th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Krakow, Poland, 10-14 September 2011. *European Thyroid Journal*, Launching Issue September 2011; 172: P237 (prezentovaný poster)
16. **Václavíková E**, Dvořáková Š, Sýkorová V, Včelák J, Škába R, Vlček P, Bendlová B. Vliv genetických variant *RET* proto-onkogenu na patogenezi Hirschsprungovy choroby a její souvislost s medulárním karcinomem štítné žlázy. XXXIV. Endokrinologické dny, Brno, 20.-22. října 2011. *DMEV* 14; Supl. 2: str. 61-62 (prezentovaný poster)
17. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Vcelak J, Halkova T, Skaba R, Vlcek P, Bendlova B. Significant differences in frequencies of *RET* polymorphisms in Hirschsprung's disease patients and its association with medullary thyroid carcinoma. 36th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Pisa, Italy, 8-12 September 2012. *European Thyroid Journal* 2012; 1 (Suppl. 1): P1 (prezentovaný poster)
18. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Vcelak J, Halkova T, Vlcek P, Bendlova B. The influence of noncoding *RET* polymorphisms on the pathogenesis of medullary thyroid carcinoma. 2nd World Congress on Thyroid Cancer, Toronto, Canada, 10-14 July 2013. P6 <http://thyroidworldcongress.com/> (prezentovaný poster - Top Ten Posters)
19. **Václavíková E**, Dvořáková Š, Sýkorová V, Včelák J, Hálková T, Vlček P, Škába R, Bendlová B. Vliv polymorfizmů v nekódujících oblastech *RET* proto-onkogenu na patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy. XXXVI. Endokrinologické dny, Plzeň, 10.-12. října 2013. *DMEV* 16(4): str. 24 (prezentovaný poster)
20. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Vcelak J, Halkova T, Vlcek P, Bendlova B. Using next generation sequencing method in *RET* mutation-negative families with hereditary medullary thyroid carcinoma. 38th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Santiago de Compostela, Spain, 6-10 September 2014. *European Thyroid Journal* 2014; 3 (Suppl. 1); p.133, P86 (prezentovaný poster)

21. **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Vcelak J, Halkova T, Vlcek P, Bendlova B. Search for new candidate genes in *RET* mutation-negative families with hereditary medullary thyroid carcinoma using next generation sequencing. 17th European Congress of Endocrinology, Dublin, Ireland, 16-20 May 2015. *Endocrine Abstracts* 2015; 37: OC6.5 (přednáška)
22. **Václavíková E**, Dvořáková Š, Sýkorová V, Včelák J, Škába R, Poš L, Vlček P, Bendlová B. Genetické příčiny Hirschsprungovy choroby a jejich vliv na fenotypické projevy onemocnění. Imunoanalýza 2015, Lubochňa, Slovenská republika, 8.-12.6.2015. Abstrakta str. 16. (přednáška)

## Seznam příloh

**Příloha č. 1:** Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, Vlček P, Škába R. Nádory štítné žlázy a Hirschsprungova choroba: Desetileté zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou *RET* proto-onkogenu. *Vnitř Lék* 2006; 52(10): 926-934.

**Příloha č. 2:** Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Vlček P. Mnohočetná endokrinní neoplazie typ 2 - syndrom MEN 2A. *Klin Onkol* 2009; 22 Suppl: S28-S31.

**Příloha č. 3:** Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, Hálková T, **Václavíková E**. Genetika nádorů štítné žlázy a jejich molekulárně cílená léčba. *Onkologie* 2011; 5(6): 325-328.

**Příloha č. 4:** Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, **Václavíková E**, Hálková T. Nádory štítné žlázy – molekulárně genetické příčiny a možnosti cílené léčby. *Čas Lék Čes* 2012; 151(3): 123-127.

**Příloha č. 5:** Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, Hálková T, Bendlová B. Hereditární karcinomy štítné žlázy a jejich molekulární diagnostika. *Česk Patol* 2014; 50(2): 81-86.

**Příloha č. 6:** Dvořáková Š, **Václavíková E**, Škába R, Kavalcová L, Bendlová B. Hirschsprungova choroba a její genetické příčiny. *Čes-slov Pediat* 2013; 68(3): 167-176.

**Příloha č. 7:** Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Ryska A, Cap J, Vlcek P, Duskova J, Kodetova D, Holub V, Novak Z, Bendlova B. Double Germline Mutations in the *RET* Proto-oncogene in MEN 2A and MEN 2B Kindreds. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2006; 114(4): 192-196. (IF – 1,760)

**Příloha č. 8:** Holub V, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Ryška A, Čáp J, Vlček P, Dušková J, Kodetová D, Novák Z, Bendlová B. Význam molekulárně genetického vyšetření u syndromu mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2A na příkladu jedné rodiny o třech generacích. *Prakt Lék* 2007; 87(3): 157-159.

**Příloha č. 9:** Maruna P, Duskova J, Limanova Z, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Bendlova B. Mixed medullary and follicular cell carcinoma of the thyroid in a 71-year-old man with history of malignant melanoma. *Med Sci Monit* 2008; 14(4): CS31-36. (IF – 1,216)

**Příloha č. 10:** Ryska A, Cap J, **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Bendlova B, Hovorkova E, Kohout A. Paraganglioma-like medullary thyroid carcinoma: fine needle aspiration cytology features with histological correlation. *Cytopathology* 2009; 20(3): 188-194. (IF – 1,470)

**Příloha č. 11:** **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, Dvorakova K, Vlcek P, Skaba R, Zelinka T, Bendlova B. *RET* mutation - Tyr791Phe - the genetic cause of different diseases derived from neural crest. *Endocrine* 2009; 36(3): 419-424. (IF – 3,527)

**Příloha č. 12:** Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, Novak Z, Bendlova B. New Multiple Somatic Mutations in the *RET* proto-oncogene Associated with a Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2006; 16(3): 311-316. (IF – 3,843)

**Příloha č. 13:** Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, Ryska A, Laco J, Cap J, Kodetova J, Kodet R, Krskova L, Vlcek P, Astl J, Vesely D, Bendlova B. Somatic mutations in the *RET* proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 284(1-2): 21-27. (IF – 4,241)

**Příloha č. 14:** Skaba R, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Vlcek P, Frantlova M, Bendlova B. The risk of medullary thyroid carcinoma in patients with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(12): 991-995. (IF – 1,061)

**Příloha č. 15:** **Vaclavikova E**, Kavalcova L, Skaba R, Dvorakova S, Macokova P, Rouskova B, Bendlova B. Hirschsprung's disease and medullary thyroid carcinoma: 15-year experience with molecular genetic screening of the *RET* proto-oncogene. *Pediatr Surg Int* 2012; 28(2): 123-128. (IF – 1,061)

**Příloha č. 16:** **Vaclavikova E**, Dvorakova S, Skaba R, Pos L, Sykorova V, Halkova T, Vcelak J, Bendlova B. *RET* variants and haplotype analysis in a cohort of Czech patients with Hirschsprung disease. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e98957. doi:10.1371/journal.pone.0098957 (IF – 3,534)