

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra Biochemie

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the PhD. thesis



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

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

Mgr. Eliška Václavíková

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Běla Bendlová, CSc.

Praha, 2015

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
1. Úvod	5
2. Cíle práce	8
3. Materiál a metody	8
4. Výsledky a diskuze	10
5. Závěr	16
1. Introduction	18
2. Aims of the study	21
3. Material and methods	21
4. Results and discussion	23
5. Conclusions	29
Použitá literatura / References	31
Seznam zkratk / Abbreviations	34
Curriculum vitae	35
Publikační a prezentační činnost / Publications and presentations of the author	39

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 familiálních 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.

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.

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.

The thesis was supported by grant projects GAUK 411611, GACR 301/06/P425, IGA MH CR NR/7806-3, IGA MH CR NR/9165-3, IGA MH CR NT13901-4 and RVO MH CR 00023761.

1. Úvod

Medulární karcinom štítné žlázy (MTC), Hirschsprungovu chorobu (HSCR) a feochromocytom spojuje jejich společné zařazení mezi jednoduché neurokristopatie, čili onemocnění spjatá s tkáněmi a buňkami, jejichž původ je v neurální liště. Syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie (MEN) typu 2, který sdružuje MTC zejména s feochromocytomem, je klasifikován mezi komplexní neurokristopatie (Bolande 1997). Mezi buňky neurální lišty řadíme parafolikulární buňky štítné žlázy, jejichž zmnožením vzniká MTC, enterické gangliové buňky, jejichž absencí v gastrointestinálním traktu se manifestuje Hirschsprungova choroba, a chromafinní buňky dřeně nadledvin, ze kterých vzniká feochromocytom.

Velmi podstatnou úlohu v patogenezi těchto onemocnění má *RET* proto-onkogen, který kóduje membránový tyrozinkinázový receptor exprimující se v buňkách pocházejících z neurální lišty (Avantaggiato et al. 1994). *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.

1.1 Medulární karcinom štítné žlázy

Karcinomy štítné žlázy představují nejčastější malignitu endokrinních žláz a 8 % z nich zaujímá medulární karcinom štítné žlázy (MTC). MTC jako jediný vychází z parafolikulárních buněk štítné žlázy, manifestuje se především ve sporadické formě (75 %), ale ve čtvrtině případů se onemocnění dědí autosomálně dominantně. Familiární forma se vyskytuje ve třech variantách – jako součást syndromu mnohočetné endokrinní neoplázie (MEN) typu 2A a 2B a jako familiární medulární karcinom štítné žlázy (FMTC). U pacientů s MEN 2A bývá MTC asociován s feochromocytomem a primární hyperparathyreózou a onemocnění se objevuje i před 20. rokem života pacienta. Pro pacienty s agresivnějším syndromem MEN 2B jsou kromě MTC a feochromocytomu typickými symptomy marfanoidní habitus, slizniční neurinomy, ganglioneuromatóza a oční anomálie, k manifestaci MTC dochází většinou mezi 10. – 20. rokem života pacienta. U FMTC se žádné jiné asociované léze nevyskytují, věk onemocnění je variabilní. Při diagnostice MTC se využívá skutečnosti, že normální i nádorově transformované C-buňky produkují hormon kalcitonin a při nádorovém procesu hladiny kalcitoninu v krvi stoupají. 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 (Vlček et al. 2002, de Groot et al. 2006, Raue et al. 2012).

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 signální 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. V případě sporadického medulárního karcinomu jsou příčinou onemocnění genetické alterace přítomné pouze v nádoru, tedy na potomstvo nepřenositelné. Somatické mutace v nádorové tkáni bývají přítomné u 40-65 % pacientů se sporadickou formou MTC (Ciampi et al. 2013, Moura et al. 2009).

Vzhledem k možnostem molekulárně genetického vyšetření se v rodinách s familiární formou MTC zásadně změnila prevence a léčba MTC. Zatímco dříve se spoléhalo na sledování hladin kalcitoninu v krvi, dnes má nejdůležitější úlohu právě genetický screening. Systematicky by měli být screenováni všichni pacienti s MTC, protože ani zdánlivě sporadický případ nevyklučuje zárodečnou mutaci *de novo* (Elisei et al. 2007). V případě detekce zárodečné mutace jsou vyšetřeni i rodinní příslušníci pacienta s MTC. U nositelů mutace se pak může přistoupit k preventivnímu odstranění štítné žlázy ještě v preklinickém stadiu a naopak jedinci, u kterých se mutace nepotvrdí, mohou být ze sledování zcela vyřazeni. U pacientů s MTC bez zárodečné mutace je k potvrzení sporadického výskytu optimální provést ještě genetickou analýzu z nádorové tkáně. Přítomnost somatické mutace v *RET* proto-onkogenu zcela vyvrátí dědičnou formu MTC a riziko pro rodinné příslušníky.

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. Dle vysledovaných poznatků byla postupně vypracována a zdokonalována klasifikace zárodečných mutací, které byly rozříděny do tří kategorií dle jejich rizikovosti (de Groot et al. 2006, Kloos et al. 2009, Machens et al. 2012). Zvlášť významným aspektem je načasování profylaktické operace u asymptomatických nositelů mutace. Pokyny pro profylaktickou TTE zohledňují záchyt nejmladších pacientů s histologicky potvrzeným MTC (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.

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. Také vzhledem k nízké penetranci, fenotypické heterogenitě a variabilitě věku onemocnění u některých 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).

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.

Na toto téma jsme publikovali několik přehledových článků, které jsou v disertační práci uvedeny in extenso v přílohách. Úplné citace jsou uvedeny v publikační aktivitě autorky.

Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, et al. *Vnitř Lék* 2006; 52(10): 926-934.

Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Vlček P. *Klin Onkol* 2009; 22 Suppl: S28-S31.

Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, Hálková T, **Václavíková E**. *Onkologie* 2011; 5(6): 325-328.

Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, **Václavíková E**, et al. *Čas lék čes* 2012; 151(3): 123-127.

Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, Hálková T, Bendlová B. *Česk Patol* 2014; 50(2): 81-86

1.2 Hirschsprungova choroba

Hirschsprungova choroba (HSCR) je vrozené onemocnění enterického nervového systému, které je charakterizováno absencí gangliových buněk submukózního Meissnerova a myenterického Auerbachova plexu podél variabilní délky distálního gastrointestinálního traktu. Etiopatogenetická příčina HSCR spočívá především v defektu migrace neuroblastů během 5. – 12. gestačního týdne. Rozsah postižení střeva se odvíjí od toho, v jaké fázi těhotenství dojde k přerušení migrace. Nejčastější formou (75 %) je klasická rekto-sigmoideální forma (RS-HSCR), dlouhá forma (LCA) pak zasahuje větší část tlustého střeva, často pod lienální ohbí, a v případě totální aganglionózy tlustého střeva (TCA) je postiženo celé tlusté střevo a část terminálního ilea. Ve velmi vzácných případech může být navíc postiženo i téměř celé (NTSBA) nebo celé tenké střevo (TIA).

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 (Holschneider et al. 2000, Amiel et al. 2008).

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. HSCR je diagnostikována buď záhy po narození pacienta, nebo v batolecím věku, většinou však do věku 2 let (Kessmann et al. 2006, Mihál et al. 2009).

HSCR se vyskytuje sporadicky (80 %) nebo familiárně (20 %). Izolovaná HSCR představuje polygenní onemocnění s principy nemendelovské dědičnosti. Mendelovská dědičnost se naopak uplatňuje u syndromické HSCR, kdy je HSCR součástí různých syndromů (v 90 % je doprovázena trizomií 21). 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*) segregujících s HSCR. Majoritní roli zde ovšem hraje *RET* proto-onkogen, kde se uplatňují mutace inaktivující, detekované u 50 % pacientů s familiární formou HSCR a u 15-20 % pacientů se sporadickým výskytem (Amiel et al. 2008, Miao et al. 2010).

Ve vzácných případech je 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. Vznik MTC hrozí nejméně 5 % pacientů s detekovanou mutací v *RET* proto-onkogenu. Screening zárodečných mutací 10. exonu je 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. Zvažuje se proto 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 (Burzynski et al. 2005, Emison et al. 2010, Crockett et al. 2011).

Na toto téma jsme publikovali přehledový článek, který je v disertační práci uveden in extenso v příloze. Úplná citace je uvedena v publikační aktivitě autorky.

Dvořáková Š, Václavíková E, Škába R, Kavalcová L, et al. *Čes-slov Pediat* 2013; 68(3): 167-176.

2. Cíle práce

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. Materiál a metody

3.1 Studované soubory

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). DNA banka pacientů s HSCR shromažďuje 214 pacientů 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 TCA, 5 pacientů s NTSBA a 2 pacientů s TIA. 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.

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 a přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách a vzdálených metastáz, multifokalita nádoru a recidiva onemocnění. 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

V současné době je na našem pracovišti izolace DNA z periferní krve založena na principu kolonek se silikátovými membránami - QuickGene DNA Blood Kit L (KURABO Industries) a provádí se na poloautomatickém izolátoru DNA QuickGene-610L (FujiFilm). Izolace DNA ze zamražené odoperované nádorové tkáně se provádí Trizolovou izolací dle firemního návodu (Invitrogen). DNA z nádorové tkáně v parafinových bločcích se izoluje pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Genetické vyšetření pacientů s MTC a HSCR se provádí obousměrnou sekvenací (dle Sangera) sedmi rizikových exonů (8., 10., 11., 13., 14., 15., 16.). Ostatní exony byly sekvenovány u vybraných jedinců s preferencí pacientů s podezřením na familiární formu MTC a HSCR či u agresivnějších forem HSCR.

Amplifikace exonů *RET* proto-onkogenu pomocí PCR využívá dva enzymy - Elongase enzyme Mix (Invitrogen) pro 11. exon a AmpliTaqGold with GeneAmp (Applied Biosystems) pro zbylé exony. Po ověření amplifikace kontrolní elektroforézou se PCR produkty purifikují s využitím technologie Agencourt založené na bázi paramagnetických částic (Ampure XP). K sekvenační reakci je užíván DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) s fluorescentně značenými dideoxynukleotidy, výsledné PCR produkty jsou purifikovány (CleanSEQ, Agencourt). Vlastní analýza se provádí na kapilárním sekvenátoru CEQ 8000 (Beckman Coulter), po níž jsou sekvence jednotlivých fragmentů DNA porovnávány s referenční sekvencí (NM_020975.4) a vyhodnoceny.

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, které jsou připraveny pomocí Long Range PCR (Qiagen). Sekvence probíhá na přístroji MiSeq (Illumina) s využitím kitu na přípravu genomové knihovny Nextera (Illumina).

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).

Nově nalezené mutace či varianty neznámého významu byly otestovány *in silico* pomocí veřejně dostupných programů PolyPhen-2, SIFT a Align-GVGD používajících různé algoritmy k predikci potenciálního dopadu záměny aminokyseliny na funkci proteinu.

Frekvence polymorfismů byly statisticky zhodnoceny a porovnány mezi studovanými soubory pomocí chí-kvadrát testu a programu NCSS 2004. Analýza vazby mezi polymorfismy byla provedena za pomoci programu Haploview (verze 4.1), který dokáže identifikovat haplobloky zahrnující polymorfismy v silné vazebné nerovnováze. 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 a diskuze

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

Vyšetření zárodečných mutací v *RET* proto-onkogenu u pacienta s MTC představuje sekvenční analýzu rizikových exonů (8., 10., 11., 13., 14., 15. a 16. exon), ve kterých bylo dle odborné literatury zachyceno 98 % zárodečných mutací v souvislosti s fenotypem MTC (Raue et al. 2012). V případě detekce zárodečné mutace je u pacienta zhodnocena její agresivita, predikován průběh onemocnění a riziko pro rodinu. Při pozitivním záchytu mutace u rodinného příslušníka 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 může být z klinického screeningu vyloučen.

Z celkového počtu 490 testovaných pacientů a 381 rodinných příslušníků byla zárodečná mutace nalezena u 60 pacientů a 73 testovaných příbuzných; 114 členů rodin mohlo být díky negativnímu výsledku vyloučeno z dalšího klinického screeningu.

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 došlo u staršího syna k vzestupu kalcitoninu v 7 letech, mladší syn měl zvýšené hladiny kalcitoninu již ve 3 letech. Po výkonu TTE byl histologicky prokázán nález MTC a oboustranné CCH u obou pacientů. 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 je proto indikována profylaktická TTE s centrální disekcí lymfatických uzlin před dovršením věku 1 roku. V souladu se světovými studiemi bylo v našem souboru pozorováno, že mutace Met918Thr v 16. exonu představuje nejvyšší riziko a manifestaci MTC v rozmezí věku 4-31 let.

U pacientů s MEN 2A byla nejčastěji (79 %) detekována zárodečná mutace v 11. exonu v kodónu 634, kde byl cystein nahrazen jinou aminokyselinou. Častý záchyt této mutace odpovídá světovým datům, s čímž souvisí i vysoké riziko feochromocytomu a primární hyperparathyreózy. 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. 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). Pravděpodobně z důvodu mírnějších klinicko-genetických kritérií pro zařazení pacientů do kategorie rodin s FMTC je náš detekční záchyt mutací v *RET* proto-onkogenu u FMTC nižší (69 %) než udávají světové studie. 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.

Překvapivě vysoký byl výskyt mutace Tyr791Phe ve 13. exonu *RET* proto-onkogenu, která byla zaznamenána 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. Mutace

Tyr791Phe byla prvně publikována jako *de novo* u pacienta s HSCR (Seri et al. 1997), později u MTC (Berndt et al. 1998) 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). Dlouhou dobu byla proto jednoznačně považována za méně agresivní aktivující mutaci způsobující FMTC, u níž se profylaktická TTE provádí mezi 5. a 10. rokem věku (de Groot et al. 2006, Kloos et al. 2009). Během posledních pěti let se však stala velice diskutovanou a rozporuplnou. Objevily se studie porovnávající záchyt Tyr791Phe u pacientů a zdravých kontrol a docházející k závěru, že je jde o vzácnou benigní variantu, samu o sobě nezvyšující riziko pro vznik MTC (Erlic et al. 2010, Toledo et al. 2015).

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. Z usnesení The European Molecular Genetics Quality Network (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.

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.

Naše výsledky a závěry spolu s korelacemi s fenotypovými projevy onemocnění jsou popsány v publikacích, které se detekci zárodečných mutací u českých pacientů s MTC věnují a kde je také popsáno několik zajímavých kazuistik. Publikace jsou k disertační práci přiloženy in extenso. Úplné citace jsou uvedeny v publikační aktivitě autorky.

Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Ryska A, Cap J, et al. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2006; 114(4): 192-196.

Holub V, Dvořáková S, **Václavíková E**, Ryška A, et al. *Prakt Léč* 2007; 87(3): 157-159.

Maruna P, Duskova J, Limanova Z, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, et al. *Med Sci Monit* 2008; 14(4): CS31-36.

Ryska A, Cap J, **Vaclavikova E**, Dvorakova S, et al. *Cytopathology* 2009; 20(3): 188-194.

Vaclavikova E, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, et al. *Endocrine* 2009; 36(3): 419-424.

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

Somatické mutace v *RET* proto-onkogenu způsobují nepřetržitou aktivaci RET proteinu, která vede až ke vzniku a manifestaci MTC. Z 90 pacientů se sporadickým MTC byla mutace v nádorové tkáni detekována u 40 z nich (44 %). Prevalence somatických mutací je tedy v našem souboru pacientů srovnatelná s jinými studiemi, kde se frekvence detekovaných mutací pohybuje mezi 40 % (Ciampi et al. 2013) a 65 % (Moura et al. 2009).

Nejčastější somatickou mutací v *RET* proto-onkogenu nalezenou v našem souboru pacientů se sporadickým MTC je Met918Thr v 16. exonu (65 %). 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).

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). V našem souboru byly tyto mutace odhaleny u 16 % vyšetřovaných tumorů, v dalších studiích se záchyt mutací detekovaných zejména v 10., 11. a 15. exonu 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 vyšetření 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.

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.

Detekci somatických mutací u českých pacientů s MTC se věnují dvě publikace, které jsou k disertační práci přiloženy in extenso. Úplné citace jsou uvedeny v publikační aktivitě autorky.

Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Duskova J, et al. *Thyroid* 2006; 16(3): 311-316. Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Vcelak J, et al. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 284(1-2): 21-27.

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

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 (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. Záměna bazí v DNA může narušit či vytvořit alternativní místo sestřihu vedoucí k syntéze alterovaného proteinu, u nesynonymních polymorfismů se předpokládá vliv na dimerizaci *RET* proteinu či tvorbu nových fosforylačních míst v tyrozinkinázové doméně.

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. Frekvence variantních alel se signifikantně lišily pouze u dvou ze 12 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 %).

Jedním z cílů této studie bylo také se zaměřit na varianty v 1. intronu a 2. exonu (rs1864410, rs2435357, rs2506004 a rs1800858), 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 publikována s výjimkou polské studie (Borun et al. 2012), ve které nebyla u pacientů s MTC nalezena variantní alela T polymorfismu rs2435357. V naší studii (provedené na vícepočetných souborech) byly ovšem frekvence tohoto polymorfismu u pacientů a kontrol srovnatelné 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. Variantní alely 4 polymorfismů byly zastoupeny signifikantně více u pacientů s TNM klasifikací T2–T4 vs. T1 ($p=0,003$) a N1 vs. N0 ($p=0,03-0,05$) a distribuce se také významně lišila u pacientů bez recidivy vs. s recidivou ($p=0,01$) a pacientů bez lokální vs. s lokální recidivou ($p=0.02$). 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.

Publikace uvedených výsledků je v přípravě.

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

V našem souboru byly detekovány zárodečné mutace u 28 pacientů s HSCR (13,1 %). V závislosti na fenotypu onemocnění, čím závažnější je forma onemocnění, tím vyšší je záchyt mutací. Zatímco pacienti s krátkou formou měli záchyt 6,5 %, u LCA byl již 16,7 %. Vysoká detekce mutací byla u pacientů s TCA - 8 z 27 (29,6 %) vyšetřených pacientů mělo detekovanou mutaci v *RET* proto-onkogenu. Mutace 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 % (Tomiyama 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.

Duální mutace byly zaznamenány ve dvou českých rodinách – v jedné Cys609Tyr a ve druhé Cys620Arg. Na příkladech těchto dvou rodin lze demonstrovat oprávněnost velmi přísných doporučení ohledně výkonu profylaktické totální thyreoidektomie (TTE) u těchto mutací (Kloos et al. 2009), když u 8leté pacientky histologie potvrdila již CCH, tedy preneoplastický proces, a u dalších 3 nositelek mutace byl prokázán MTC v časně fázi. Koexistence obou dvou onemocnění je velice vzácná, uvádí se data srovnatelná s naším souborem (Pakarinen et al. 2005, Amiel et al. 2008). Mutace v kodónu 620 je zachycena v 50 % těchto případů, 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).

Byla zaznamenána celá řada dosud nepopsaných variant, které byly otestovány *in silico* pomocí tří modelů odhadující škodlivost mutace - PolyPhen-2, SIFT a Align-GVGD. Pouze mutace Arg969Gly v 17. exonu byla přesvědčivě určena jako patogenní všemi třemi algoritmy. 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. Zajímavá je také 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.

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. Mnoho publikací, ve kterých se autoři zaměřili na hledání zárodečných mutací v ostatních rizikových exonech genu, popř. vyšetření rozšířili na celý gen, neexistuje. 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. Kromě rizika MTC, mohou být mutace navíc kauzální v souvislosti s HSCR a i to může být informace zajímavá pro pacienta a jeho genetického poradce - klinického genetika.

Výsledky a závěry této studie jsou popsány ve dvou publikacích, které jsou přiloženy k disertační práci *in extenso*. Úplné citace jsou uvedeny v publikační aktivitě autorky.

Skaba R, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Vlcek P, et al. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(12): 991-995.

Vaclavikova E, Kavalcova L, Skaba R, Dvorakova S, et al. *Pediatr Surg Int* 2012; 28(2): 123-128.

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

Vazebná analýza u pacientů s HSCR ukazuje, že onemocnění je spojeno s *RET* proto-onkogem 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.

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. Naše kontrolní populace byla porovnána s dostupnými daty evropské normální populace a frekvence studovaných polymorfismů jsou srovnatelné (Lesueur et al. 2002). 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 %). Homozygotní diplotyp TTAA,TTAA riziko ještě zvyšuje (OR=17,56). 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).

Hypotézu některých pracovišť (Lantieri et al. 2006, Griseri et al. 2007, Pan et al. 2012) o rozdílné roli polymorfismů ve dvou různých oblastech, kdy vedle rizikového haplotypu v 5' oblasti genu existuje naopak protektivní 3' oblast, jsme nepotvrdili. Z našich výsledků vyplývá, že nelze označit 3' oblast za protektivní, protože kromě protektivních polymorfismů rs1799939 a rs1800863 jsme u pacientů v této části genu zaznamenali i varianty spojené se zvýšeným rizikem oproti běžné populaci (rs2565200, rs2435355, rs1800861).

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). 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.

Výsledky a závěry této studie jsou popsány v publikaci přiložené k disertační práci *in extenso*. Úplná citace je uvedena v publikační aktivitě autorky.

Vaclavikova E, Dvorakova S, Skaba R, Pos L, et al. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e98957.

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 TTA A 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.

1. Introduction

Medullary thyroid carcinoma (MTC), Hirschsprung's disease (HSCR) and pheochromocytoma are classified as simple neurocristopathies, i.e. diseases linked to neural crest-derived cells. Syndrome of multiple endocrine neoplasia (MEN) type 2, that associates MTC especially with pheochromocytoma, is classified as complex neurocristopathy (Bolande 1997). Thyroid parafollicular cells from which MTC arises, enteric ganglion cells which absence in the gastrointestinal tract Hirschsprung's disease is manifested, and chromaffin cells in adrenal medulla from which pheochromocytoma arises belong to the group of neural crest-derived cells.

In these cells, a transmembrane tyrosine kinase receptor RET (REarranged during Transfection) is expressed, coding by the *RET* proto-oncogene (Avantaggiato et al. 1994). This gene plays an important role in differentiation, proliferation and development of neuroendocrine cells. It is located on chromosome 10q11.2, and consisted of 21 exons with the length of 55 kb (Pasini et al. 1995).

1.1 Medullary thyroid carcinoma

Thyroid carcinomas are the most frequent malignancy in the endocrine glands and MTC represents 8% of all thyroid carcinomas. Only MTC arises from parafollicular cells and is manifested mainly in a sporadic form (75%), but 25% of cases are inherited autosomal dominantly. Hereditary forms comprise familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) and syndromes of MEN type 2A and 2B. In patients with MEN 2A, MTC is associated with pheochromocytoma and primary hyperparathyroidism and the disease is manifested before the age of 20. Typical clinical symptoms in patients with more aggressive syndrome of MEN 2B are pheochromocytoma, marfanoid habitus, mucosal neuromas, intestinal ganglioneuromatosis and thick corneal nerves, and the disease is manifested mostly at the age of 10 – 20. In FMTC no associated lesions occur and the age of disease onset is variable. Because normal as well as transformed parafollicular cells produce calcitonin, calcitonin levels are elevated during tumorigenesis, and are used as a tumor marker. Therapy involves a radical surgery, known as total thyroidectomy (TTE), which is based on complete removal of the thyroid gland. If the lymph nodes of neck are affected, a modified radical neck dissection is also indicated (Viček et al. 2002, de Groot et al. 2006, Raue et al. 2012).

FMTC and syndromes of MEN 2 are considered for monogenic diseases, because activating germline mutations in the *RET* proto-oncogene are only known cause associated with the disease. The *RET* proto-oncogene was discovered and localised on the basis of linkage analysis in MEN 2 families between 1985-1987 (Takahashi et al. 1985, Mathew et al. 1987, Simpson et al. 1987). The whole sequence was published in 1993 (Mulligan et al. 1993, Mulligan et al. 1994). Subsequently, germline mutations associated with aggressive forms of hereditary MTC were revealed (Donis-Keller et al. 1993, Mulligan et al. 1993, Hofstra et al. 1994). In MEN 2B patients, the major mutation Met918Thr in exon 16 was found, which causes constitutive activation of a receptor independently of ligand interaction and dimerization. Mutations at cysteine codons 609, 611, 618, 620, 630, 634 in exons 10 and 11 were found significant in manifestation of MEN 2A/FMTC. These mutations cause dimerization of RET receptor (independently of ligand interaction) and activate signaling pathways. The searching for germline mutations was extended to other exons and between 1995-1998 mutations in exons 13, 14 and 15 at codons 768, 790, 791, 804 and 891 were revealed, which were mainly associated with FMTC and moderate manifestation of the disease. In sporadic MTC, causative somatic alterations are only present in a tumor and are non-transmissible to offspring. Somatic mutations in tumor tissue are present in 40-65% of patients with sporadic MTC (Ciampi et al. 2013, Moura et al. 2009).

Thanks to molecular genetic testing in families with hereditary MTC, the prevention and treatment of MTC have been radically changed. It was previously relied on monitoring calcitonin levels and now genetic screening plays the most important role. All patients with MTC should be systematically screened, because a *de novo* germline mutation can be detected in apparently sporadic cases (Elisei et al. 2007). If the patient with MTC has a detected *RET* mutation, his family members at risk are indicated to be screened for the mutation. Then a carrier of the mutation is recommended to undergo prophylactic removal of the thyroid gland before disease onset. On the contrary, family members who are not confirmed to have a tested mutation can be completely excluded from clinical monitoring. In patients with sporadic MTC with no detectable germline mutation, it is appropriate to perform genetic analysis of tumor tissue because the presence of a somatic mutation completely refutes the hereditary MTC and the risk for family members.

Different mechanisms of activation of altered *RET* tyrosine kinase receptor is reflected in the correlation of genotype with phenotype. *RET* mutations significantly differ in their aggressiveness, disease phenotype and the risk for mutation carriers. The classification of germline mutations in the *RET* proto-oncogene was developed and they were categorized into three/four groups according to their risk for aggressive MTC development (de Groot et al. 2006, Kloos et al. 2009, Machens et al. 2012). An important aspect is the timing of prophylactic surgery for asymptomatic carriers of mutations. Guidelines for prophylactic TTE reflect the age of the youngest patient with histologically confirmed MTC (Machens et al. 2012). Therefore, the recommendation for the age of TTE is very strict, but it was observed that only very early TTE can prevent disease recurrence and lymph nodes metastases (Skinner et al. 2005). Likewise, the recommended age for screening of pheochromocytoma and primary hyperparathyroidism was designed.

Screening of risk exons in the *RET* proto-oncogene has become the basis for routine molecular genetic analysis in MTC families. Nevertheless, some families with hereditary MTC were not resolved and the cause remains not found, although the entire *RET* proto-oncogene was analysed. Due to the low penetrance, phenotypic heterogeneity and variable age of disease onset in some mutations, other genetic alterations in the *RET* proto-oncogene and other genes that could contribute to the MTC development and modulate the clinical manifestation have been investigated. It is assumed polymorphisms in *RET* exons 2, 7, 11, 13, 14 and 15 and intronic variants could predispose to MTC development and modify phenotype features (Lesueur et al. 2006, Ceolin et al. 2012, Lantieri et al. 2013).

The clarification of the genetic causes of MTC is not only important for disease prediction in asymptomatic individuals and more accurate diagnosis and disease prognosis in patients, but it could also contribute to targeted gene therapy in the future.

On this issue, we have published several articles, which were attached in extenso in the thesis supplements. The complete citation are listed in the publication activity of the author.

Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, et al. *Vnitř Lék* 2006; 52(10): 926-934.

Bendlová B, Dvořáková Š, **Václavíková E**, Vlček P. *Klin Onkol* 2009; 22 Suppl: S28-S31.

Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, Hálková T, **Václavíková E**. *Onkologie* 2011; 5(6): 325-328.

Bendlová B, Dvořáková Š, Sýkorová V, **Václavíková E**, et al. *Čas lék čes* 2012; 151(3): 123-127.

Dvořáková Š, **Václavíková E**, Sýkorová V, Hálková T, Bendlová B. *Česk Patol* 2014; 50(2): 81-86.

1.2 Hirschsprung's disease

Hirschsprung's disease (HSCR) is a congenital developmental malformation characterised by the absence of enteric ganglion cells of myenteric Auerbach's and submucosal Meissner's plexuses in the intestine. Etiopatogenetic cause of HSCR is the defect of neuroblast migration during 5th – 12th gestational week. The extent of affected intestine also depends on what stage of pregnancy the migration is interrupted. The most frequent form of HSCR (75%) is a classical rectosigmoid HSCR (RS-HSCR). A long aganglionosis (LCA) affects the larger segment of colon, total colonic aganglionosis (TCA) affects the whole colon and extends from the rectum to the terminal ileum. In rare cases, as nearly total small bowel aganglionosis (NTSBA) or total intestinal aganglionosis (TIA) comprise nearly total or the whole intestine.

The incidence of the disease is 1 per 5000 live births, but it differs between ethnic groups. From the genetic point of view, short-segment aganglionosis (S-HSCR, 80%) and long-segment aganglionosis (L-HSCR, 20%) are classified according to the length of the aganglionic segment. S-HSCR occurs four times more often in males than females, but L-HSCR is only two times more often in males than females (Holschneider et al. 2000, Amiel et al. 2008).

After the dilation process begins, the affected portion of the colon will appear normal and the more proximal colon will be dilated, megacolon forms and it leads to obstruction of colon. HSCR is diagnosed soon after the birth of the patient or in toddler age, but mostly until to the age of 2 (Kessmann et al. 2006, Mihál et al. 2009).

HSCR occurs as a sporadic form (80%) or less commonly as a familiar form (20%). Isolated HSCR presents a polygenic disorder with mechanisms of non-mendelian inheritance. Mendelian inheritance have been described in syndromic HSCR, where HSCR is associated with syndromes (trisomy 21 > 90%). To date, more than 15 genes (*RET*, *GDNF*, *NTN*, *GFRA1*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*, *SOX10*, *ZFH1B (SIP1)*, *PHOX2B*, *KIAA1279/KBP*, *TCF4*, *TTF-1*, *NRG1*, *NTRK3*) and 5 susceptibility loci have been associated with the disease. However, the inactivating germline mutations in the *RET* proto-oncogene play the major role in the pathogenesis and have been detected in 50% of patients with a familiar form of HSCR and in 15-20% patients with a sporadic HSCR (Amiel et al. 2008, Miao et al. 2010).

In rare cases, HSCR is associated with MEN 2/FMTC. It is caused by germline mutations in the *RET* proto-oncogene in exon 10 at cysteine codons 609, 611, 618 and 620, which can be both activating and inactivating depending on the tissue where *RET* is expressed. At least 5% patients with a detected *RET* mutation are at risk of MTC development. It is recommended to perform the screening of *RET* mutations in exon 10 especially in patients with TCA (Moore et al. 2012).

Although the detection rate of germline *RET* mutations is relatively low, linkage analysis show that nearly 90% of HSCR patients are in association with the *RET* proto-oncogene. Therefore, single nucleotide polymorphisms (SNPs) as well as some specific haplotypes of the *RET* proto-oncogene have been considered to have a function of genetic modifying factors in HSCR pathogenesis and influence protein expression (Burzynski et al. 2005, Emison et al. 2010, Crockett et al. 2011).

On this issue, we have published a review article, which was attached in extenso in the thesis supplement. The complete citation is listed in the publication activity of the author.

Dvořáková Š, **Václavíková E**, Škába R, Kavalcová L, et al. *Čes-slov Pediat* 2013; 68(3): 167-176.

2. Aims of the study

1. Detection of main genetic alterations in patients with medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease.
2. Study of the role of polymorphisms in the *RET* proto-oncogene as modifying factors in the pathogenesis of medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease.
3. Study of the association of genetic alterations with their phenotype manifestation in patients with medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease.

To achieve these objectives, it is necessary

- a) to continue in DNA samples collection of patients with medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease and their family members
- b) to create a database of clinical and pathological data
- c) to gather a control cohort of healthy individuals

3. Material and methods

3.1 Cohorts

Our cohort of patients with MTC comprises 490 Czech unrelated families counting 490 patients with MTC (the first affected one in a family) and 381 tested family members at risk of the disease. According to their phenotype, they are classified on families with MEN 2B (9), MEN 2A (14), FMTC (16) and patients with sporadic MTC (451). The cohort of patients with HSCR consists of 214 patients and 26 family members of tested families. According to the length of affected portion of colon, the patients are classified to patients with the most frequent short rectosigmoid form of HSCR (139) and a long form of HSCR (58) included 27 patients with TCA, 5 patients with NTSBA and 2 patients with TIA. The control cohort of healthy individuals, necessary for the study of polymorphisms and the comparison with MTC and HSCR patients, includes 205 controls (95 males and 110 females) whose case history was without thyroid diseases and Hirschsprung's disease.

Detailed clinical and pathological data have been gathered for the correlation of detected genetic alterations with phenotype manifestation. In patients with MTC, the data about age, basal and stimulated calcitonin levels before and after the operation, tumor size, presence of metastases in lymph nodes and distant metastases, multifocality of a tumor and disease recurrence have been collected. In patients with HSCR, data about age, sex, form of the disease, i.e. length and location of aganglionic portion of the intestine, and disease inheritance in a family have been observed.

3.2 Molecular genetic analysis

Currently, DNA isolation from peripheral blood is based on a separation through the porous membranes - QuickGene DNA Blood Kit L (Kurabo Industries) and is performed on the semi-

automated isolation system DNA QuickGene 610L (FujiFilm). DNA isolation from fresh frozen tumor tissue was performed using Trizol isolation according to instructions (Invitrogen). DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues was isolated using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Molecular genetic analysis of the *RET* proto-oncogene mutations in patients with MTC and HSCR was performed by direct sequencing (Sanger method) of seven risk exons (8, 10, 11, 13, 14, 15, 16) in both directions. Other exons were sequenced in selected individuals with preference of patients suspected for hereditary form of MTC and HSCR and more aggressive form of HSCR.

For amplification of *RET* exons by PCR two enzymes were utilized - Elongase enzyme Mix (Invitrogen) for exon 11 and AmpliTaqGold with GeneAmp (Applied Biosystems) for all other exons. After verifying of amplification by control electrophoresis, PCR products were purified using a technology Agencourt based on paramagnetic particles (Ampure XP). For sequencing reaction, DTCs Quick Start Kit (Beckman Coulter) with fluorescently labeled dideoxynucleotides was used, and PCR products were again purified (CleanSeq, Agencourt). The analysis was performed on a capillary sequencer CEQ 8000 (Beckman Coulter). Sequence traces were compared with *RET* reference sequence (NM_020975.4) and evaluated.

Also next generation sequencing method was established for detection of genetic alterations in the *RET* proto-oncogene. There are sequenced either classically prepared amplicons of each exon, or long amplicons covering the entire *RET* proto-oncogene prepared using Long Range PCR (Qiagen). Sequencing is proceed on the MiSeq (Illumina) using Nextera kit (Illumina) for preparation of a genome library.

For genotyping of polymorphisms in the *RET* proto-oncogene, TaqMan probes were designed (Applied Biosystems). The analysis was performed using real-time PCR method on the Light Cycler 480 (Roche).

All detected novel mutations and variants of unknown significance were tested *in silico* via publicly available programmes PolyPhen-2, SIFT and Align-GVGD using various algorithms to predict the possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein.

The frequencies of studied SNPs were statistically evaluated and compared using the NCSS programme and chi-square test with establishing p-value. For generating haplotypes, the Haploview programme (version 4.1) was used and a haplotype block of polymorphisms which were in linkage disequilibrium was constructed using Gabriel's methods. Consequently, haplotypes of the particular haploblock were generated in each individual patient and control and diplotypes were estimated using the PHASE programme (version 2.1).

4. Results and discussion

4.1 Detection of germline mutations in the *RET* proto-oncogene in patients with MTC

Genetic testing of germline mutations in the *RET* proto-oncogene in patients with MTC has been performed by analysis of risk exons (8, 10, 11, 13, 14, 15 and 16), in which 98% of germline mutations were revealed in association with MTC (Raue et al. 2012). If a germline mutation is detected in a patient, its aggressiveness is evaluated and disease progression and risk for a family are predicted. In case of the positive test in a family member, prophylactic TTE and clinical and biochemical screening for pheochromocytoma and primary hyperparathyroidism are recommended. Recommendations about the appropriate age for TTE and screening depend on the mutation classification (Kloos et al. 2009). On the contrary, a tested person could be excluded from clinical screening due to the negative genetic testing.

From total count of 490 tested patients and 381 family members, a germline mutation was detected in 60 patients and 73 tested relatives; 114 family members could be excluded from clinical screening due to the negative result of testing.

All patients with MEN 2B (100%) were carriers of the mutation in exon 16. In six patients with MEN 2B we confirmed a mutation *de novo*, as Met918Thr was not found in patient's parents. In two families, the mutation was transmitted from a mother on her descendants. In the first family, the older son had elevated calcitonin levels at the age of 7, the younger son at the age of 3 yet. After TTE, MTC and bilateral CCH was histologically confirmed in both patients. In the second family, TTE was performed on the basis of positive genetic screening with histological finding of CCH in a 6 year-old son of a patient with MEN 2B. In the literature, the youngest age of 9 month in association with MTC has been published (de Groot et al. 2006). Therefore according to the international guidelines, prophylactic TTE and lymph node dissection are indicated before the age of 1. In accordance with international studies, we have observed that Met918Thr represents the highest risk and MTC manifestation at the age of 4-31.

In patients with MEN 2A, the most frequent mutation (79%) was detected in exon 11 at codon 634 where cysteine was substituted by other amino acid. High detection rate of the mutation is comparable with other global studies. The other risk category of aggressive mutations associated with MEN 2A/FMTC is represented by mutations in exon 10 at cysteine codons 609, 611, 618 and 620, also often detected in Czech families. Families with FMTC with moderate clinical manifestation of the disease and especially late age of disease onset had a mutation detected in exons 13 and 14; Val804Met in exon 14 was very frequent. Mutations in exons 10 and 11 correlated with the age of diagnosis between 20 and 40, whereas very variable age of diagnosis (50 - 80 years of age) has been observed in mutations in exons 13 and 14. Probably due to less strict clinical-genetic criteria for the classification of FMTC families in our cohorts, the detection rate of mutations in the *RET* proto-oncogene is lower (69 %) in FMTC than global studies published. Genetically unsolved families are a great challenge for us, because besides the *RET* no gene has been discovered to be associated with FMTC. We also confirmed that genetic testing was very beneficial in all sporadic MTCs because the detection rate of germline mutations (mostly *de novo*) was 6% and presumed sporadic occurrence was excluded in these patients.

Surprisingly, high incidence was in the mutation Tyr791Phe in exon 13 that was found in 3 patients with apparently sporadic MTC, 4 families with hereditary MTC (MEN 2/FMTC), 9 families with HSCR and 1 patient with a rare malignant type of pheochromocytoma. Mutation Tyr791Phe was firstly published as a *de novo* mutation in a patient with HSCR (Seri et al. 1997) and one year

later as a new hot spot for MTC (Berndt et al. 1998). Then several functional studies were performed and result in findings that Tyr791Phe modified the tertiary structure of the catalytic domain and lead to a protein with more accessible substrate and ATP-binding conformation. RET receptor mutant is autophosphorylated and activated independently on typical RET ligand GDNF and a high degree of RET mutant is expressed at the plasma membrane (Plaza-Menacho et al. 2005). Thus the mutation was clearly considered as less aggressive activating mutation causing FMTC for which the prophylactic TTE is recommended to undergo between 5 and 10 years of age (de Groot et al. 2006, Kloos et al. 2009). However, during last five years it has become highly debated and controversial. There have been studies comparing detection of Tyr791Phe in patients and healthy controls and arriving at conclusion that it is a rare benign variant that does not increase the risk for MTC development (Erlic et al. 2010, Toledo et al. 2015).

Since a wrong interpretation can lead to the serious consequences, additional studies on a large group of healthy individuals with available detailed clinical and anamnestic data are required to determine whether this variation plays a role in MTC and HSCR pathogenesis. The resolution of the European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) suggested that each laboratory could take own opinion and interpret the variant as pathogenic and causing MTC or benign and not causing MTC. In a report of the genetic testing, however, it is undoubted duty to state that the interpretation of the variant is controversial, and the doctor who requested the examination, must be aware of two interpretations of this option.

The interpretation of Tyr791Phe and guidelines how to interpret controversial variants have been modified on the basis of recent published findings. Unfortunately, it is obvious how serious and irreversible impact on healthy carriers a wrong interpretation could have. Current practice in our department proposes to consider the variant for pathogenic before more precise findings about its role in the pathogenesis of MTC will be available, but prophylactic TTE is not recommended in association with the variant. However, the regular ultrasound examination of the thyroid and biochemical screening for MEN 2 are necessary.

The results and conclusions of genetic testing in patients with MTC and its correlations with phenotype manifestation have been published in several papers and interesting case reports which were attached in extenso in the thesis supplements. The complete citations are listed in the publication activity of the author.

Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Ryska A, Cap J, et al. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2006; 114(4): 192-196.

Holub V, Dvořáková S, **Václavíková E**, Ryška A, et al. *Prakt Léč* 2007; 87(3): 157-159.

Maruna P, Duskova J, Limanova Z, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, et al. *Med Sci Monit* 2008; 14(4): CS31-36.

Ryska A, Cap J, **Vaclavikova E**, Dvorakova S, et al. *Cytopathology* 2009; 20(3): 188-194.

Vaclavikova E, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, et al. *Endocrine* 2009; 36(3): 419-424.

4.2 Detection of somatic mutations in the *RET* proto-oncogene in patients with MTC

Somatic mutations in the *RET* proto-oncogene cause a continuous activation of RET protein which leads to the development and manifestation of MTC. In our cohort, a somatic mutation in tumor tissue was detected in 40/90 patients with sporadic MTC (44%) and the prevalence of somatic mutations is comparable with other studies, in which the detection rate ranges from 40% (Ciampi et al. 2013) to 65% (Moura et al. 2009).

The most frequent somatic mutation in the *RET* proto-oncogene found in our cohort is Met918Thr in exon 16 (65%). Methionine at codon 918 is highly conserved and lies within the substrate binding pocket of the central catalytic core of the tyrosine kinase domain. The mutation causes constitutive activation of tyrosine kinase activity as the affinity of the substrate binding pocket is altered and thus phosphorylation is increased (Santoro et al. 1995).

Other somatic alterations were detected at cysteine codons in exons 10 and 11, i.e. missense mutations (Cys618Ser, Cys620Ser, Cys630Arg, Cys634Trp), or deletions of several codons – 628-632del (c.1882-1896del), 628-633del (c.1884-1898del), 632-633del (c.1894-1899del). The mutations were revealed in 16% of analysed tumors, whereas in the other studies, the detection rate of mutations, especially in exons 10, 11 and 15, ranged from 12% to 30% (Moura et al. 2009, Boichard et al. 2012, Ciampi et al. 2013, Oczko-Wojciechowska et al. 2015).

From the correlation of clinical and pathological data with the detection of *RET* somatic mutations, the association with worse clinical outcome and larger size of a tumor was found. In a previous study (Moura et al. 2009), the patients were classified to three groups accordingly to the detected somatic mutations. On the basis of clinicopathological features, the first group of patients with a mutation in exons 15 (codons 882, 883) and 16 (Met918Thr) was significantly associated with the highest risk for aggressive MTC. It was followed by the second group of patients with no somatic mutation and intermediate risk of aggressive tumor. The lowest risk for a worse clinical outcome was presented by the group of patients with a somatic *RET* mutation in other exons.

The detection of somatic mutations in tumor tissue contributes to improving the diagnosis of sporadic MTC. Although the probability of hereditary form of MTC is negligible in the patients with no detectable germline mutations in risk exons of the *RET* proto-oncogene, the presence of a minor mutation in other routinely nonscreened exons is not completely excluded. The hereditary form of the disease may be only disproved by the detection of a somatic mutation. Moreover, the knowledge of a somatic mutation has an important role in predicting disease development and also in therapy with tyrosine kinase inhibitors, in which the knowledge of a specific mutation is crucial for choosing of suitable treatment.

Two papers devoting to the detection of somatic *RET* mutations in Czech patients with MTC were attached in extenso in the thesis supplements. The complete citations are listed in the publication activity of the author.

Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Duskova J, et al. *Thyroid* 2006; 16(3): 311-316. Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Sykorova V, Vcelak J, et al. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 284(1-2): 21-27.

4.3 Study of polymorphisms in the *RET* proto-oncogene in patients with MTC

Due to variable expressivity and penetrance, phenotype heterogeneity and variable age of disease onset in *RET* mutations, other genetic alterations in the *RET* proto-oncogene and other genes, that could contribute to the development and modulation of clinical manifestation of MTC, have been investigated. The linkage studies also in patients with no identified causative mutation indicate that the *RET* proto-oncogene is a major gene in the pathogenesis of MTC. It is assumed that also common polymorphisms may have a modifying effect and be capable to affect the protein expression and behavior (Lesueur et al. 2006 Ceolin et al. 2012, Lantieri et al. 2013). The exact mechanism of the impact of polymorphisms on disease progression has been still argued. Bases exchange in DNA could interrupt and/or create an alternative splicing site, leading to the synthesis of an altered protein with another ligand binding capacities. In non-synonymous polymorphisms, it can be assumed that the modification has a cooperative effect on the dimerization of the RET protein or forms a new phosphorylation site in the tyrosine kinase domain.

In a study of the impact of polymorphisms in the *RET* proto-oncogene on the development and modulation of the disease, the cohort of 341 patients with sporadic MTC and a control group of 205 healthy individuals were compared. The frequency of variant alleles significantly differed in only two out of 12 studied polymorphisms – IVS14-24G/A ($p = 0.002$) and rs2435355 ($p = 0.04$), where the minor allele was significantly underrepresented in patients vs. controls (16% vs. 24%, 20% vs. 25%, respectively).

The aim of the study was also to focus on the variants in intron 1 and exon 2 (rs1864410, rs2435357, rs2506004 and rs1800858), which had been previously found to be significantly associated with increased risk for HSCR development (Part 4.5). These variants composing a haploblock are in a strong linkage disequilibrium. To the best of our knowledge, no study of these SNPs was not published in association with MTC except Polish study (Borune et al. 2012), in which no variant allele T of rs2435357 was surprisingly found in patients with MTC. However, in our study (of larger cohorts than in Polish study), the frequency of this polymorphism was similar in patients and controls and there were represented even TT homozygotes (6% vs. 9%, respectively). Although the distribution of these four variants did not significantly differ between patients and controls, the correlation with clinical and pathological data revealed the significant association of minor alleles with worse clinical outcome, particularly with TNM classification (tumor size, lymph node and distant metastases) and disease recurrence. Minor alleles of these 4 SNPs were significantly overrepresented in patients with TNM classification T2-T4 vs. T1 ($p = 0.003$) and N1 vs. N0 ($p = 0.03$ to 0.05). The distribution of polymorphisms also significantly differed in patients without recurrence vs. patients with disease recurrence ($p = 0.01$) and in patients without local recurrence vs. patients with local recurrence ($p = 0.02$). The patients with recurrence, lymph node metastases, and TNM classification T2-T4 had minor alleles overrepresented (27%) compared to patients without recurrence, without lymph node metastases, and TNM classification T1 (16%). However, minor alleles were represented in the patients with recurrence, lymph node metastases, and TNM classification T2-T4 comparably to the control group (28%) as. It seems that a minor allele does not impact the disease onset but it can modify it and it is associated with the increased risk of worse clinical outcome of the disease.

These results are being prepared to publishing.

4.4 Detection of germline mutations in the *RET* proto-oncogene in patients with HSCR

In our cohort of patients with HSCR, germline mutations were detected in 28 patients (13%). Considering the length of affected portion of the intestine, the detection of mutations increases with increasing severity of the disease. Whereas in patients with S-HSCR the detection rate was 6.5 %, in LCA was 17%. The high rate of *RET* mutations was in TCA, a mutation was detected in 8/27 (30%) tested patients. Also in the most rare and severe TIA, both patients had a detected *RET* mutation in exons which were not risk for MTC, as well as in NTSBA a mutation was found in 2/5 patients (40%). In NTSBA/TIA, previous studies describe detection rate of *RET* mutations 70% (Tomiya et al. 2001, Solari et al. 2003, Ruttenstock et al. 2009). The mutations were detected mostly along the entire *RET* gene and often outside of exons routinely investigated for MTC risk.

Mutations Cys609Tyr and Cys620Arg with dual function (activating, inactivating) were detected in two Czech families. Here we can demonstrate the legitimacy of strict recommendations for prophylactic TTE in this category of mutations (Kloos et al. 2009). CCH, a preneoplastic process, was confirmed in only 8 year-old patient, and MTC in early stage was histologically proven in other three carriers of the mutation. Co-existence of both diseases is very rare and worldwide data are comparable with our study (Pakarinen et al. 2005, Amiel et al. 2008). In studies, the mutation at codon 620 was found in 50% of patients with a dual mutation. This fact is consistent with studies showing that mutations which are closer to a transmembrane domain play more important role in cell proliferation and activation in tumorigenesis (Kjaer et al. 2006, Moore et al. 2012).

A large number of novel variants was detected and all were tested *in silico* using three programmes predicting the pathogenicity of a mutation – PolyPhen-2, SIFT and Align-GVGD. Only mutation Arg969Gly in exon 17 was evaluated as pathogenic by all three algorithms. Other variants were evaluated with different outcomes. It is appropriate that different algorithms for impact of mutations assessment can significantly vary and it is difficult to conclude the mutations to be pathogenic or benign. More reliable method is a functional study, but recently with so many unknown variants detected using modern molecular genetic methods, it is more comfortable to proceed first *in silico* analysis and filter benign variations. Our results show, however, that is not possible to make conclusions on the basis of only one algorithm, and it is necessary to compare several approaches. Also interesting is the 2 bp deletion c. 1760-2_1760-1delAG detected at the end of intron 9 in the site of consensus sequence for control of RNA splicing. This deletion that is likely to cause abnormal splicing has been described in the literature in a patient with HSCR (So et al. 2011), but also as somatic in tumor tissue of a patient with pheochromocytoma (Beldjord et al. 1995). It is therefore possible that it may have an activating and an inactivating function.

Screening of *RET* germline mutations in all patients with HSCR is not worldwide a standard routine. Some centers perform routine screening of exon 10, but only in patients with L- HSCR. There have not been published many studies focusing on the analysis of neither other risk exons besides exon 10, nor extending to the entire *RET* proto-oncogene. Contrary to some centres (Bütter et al. 2007, Kloos et al. 2009) we prefer sequencing of all seven risk exons in patients with all forms of HSCR. In familiar forms of HSCR, we recommend to extend the analysis for the entire *RET* proto-oncogene. Moreover, identification of a causative mutation is important for genetic counseling in families with HSCR and in future, it could be beneficial in preimplantation genetic diagnosis.

The results of the study have been published in two papers which were attached in extenso in the thesis supplements. The complete citations are listed in the publication activity of the author.

Skaba R, Dvorakova S, **Vaclavikova E**, Vlcek P, et al. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(12): 991-995.

Vaclavikova E, Kavalcova L, Skaba R, Dvorakova S, et al. *Pediatr Surg Int* 2012; 28(2): 123-128.

4.5 Study of polymorphisms in the *RET* proto-oncogene in patients with HSCR

The results of linkage studies indicate that HSCR is associated with the *RET* proto-oncogene also in patients with no identified causative mutation. Therefore, it is assumed that polymorphisms could have (e.g. in a specific haplotype) a modifying effect and influence the disease pathogenesis.

Fourteen variants in the *RET* proto-oncogene were selected to our study of the modifying effect on the development and phenotypic manifestation of HSCR. We focused on the variants detected in routinely screened exons (risk for MTC), but also in intronic and interesting regions of the gene. SNP analysis revealed significant differences in frequencies of 11 polymorphic *RET* variants between 162 HSCR patients and 205 unaffected controls. Allele frequencies in our tested normal population were similar with frequencies in previously reported in a European control population (Lesueur et al. 2002). A high risk (OR=6.67; CI 95% (4.82-9.23), $p < 0.000001$) was found in association with four studied polymorphisms - rs1864410, rs2435357, rs2506004 (intron 1) and rs1800858 (exon 2), composing a haploblock. These 4 SNPs were in the complete linkage disequilibrium and went together with almost the same genotype distribution in all cohorts. Whereas a variant allele of these SNPs occurred in 28% of normal population, it was represented in 72% of patients. Therefore there were only two main haplotypes – TTAA dominating in patients (71%), and GCCG dominating in controls (71%). Homozygote diplotype TTAA,TTAA had even increased risk (OR=17.56). These SNPs are located in a HSCR-causing region covering 27 kb in total. It is a highly conserved region called MSC+9.7 (Multi species conserved) and starts 4 kb upstream of the *RET* transcription start site and going along the way to the beginning of exon 2. TTAA haplotype decreases *RET* promoter activity, reduces the binding affinity of TTF-1 (thyroid transcription factor 1), disrupts a binding site for transcription factor SOX10, decreases enhancer for *RET* expression and thus regulates *RET* expression which was confirmed by *in vitro* studies (Burzynski et al. 2005, Garcia-Barcelo et al. 2005, Emison et al. 2010, Sribudiani et al. 2011).

We cannot confirm the hypothesis suggested in previous studies (Lantieri et al. 2006, Griseri et al. 2007, Pan et al. 2012) about the different role of SNPs in two linkage disequilibrium regions where besides the risk haplotype at the 5' end of the *RET* protooncogene, a protective function of the 3' half of the gene was proposed. Our results show that it is not possible to mark the 3' region to be protective, because apart from protective polymorphisms rs1799939 and rs1800863 there were detected variants associated with an increased risk in patients compared to general population (rs2565200, rs2435355, rs1800861).

Interestingly, although the risk associated with variant alleles of the 5' haploblock was high in both L-HSCR and S-HSCR, frequency of risk alleles was even 6% higher in the less aggressive S-HSCR. Similar results were described in rs2435357 (Emison et al. 2010) and rs1800858 (Fitze et al. 2002), whereas no difference was revealed between L-HSCR and S-HSCR in other study (Lantieri et al. 2006). However, in our cohort, the higher frequency of variant alleles in S-HSCR was likely caused by a higher representation of male patients in S-HSCR (78%) than in the L-HSCR cohort (71%). A gender effect was previously described in rs2435357 where the variant allele was present in 65% of males vs. 56% of females (Nunez-Torres et al. 2011). The risk of L-HSCR was influenced especially by rs2472737 and rs2435355 where the variant allele elevated the risk of L-HSCR nearly two fold compared to S-HSCR.

The results and conclusions of this study have been described in the publication attached to the thesis in extenso. The complete citation is listed in the publication activity of the author.

Vaclavikova E, Dvorakova S, Skaba R, Pos L, et al. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e98957.

5. Conclusions

Thyroid cancer is the most frequent endocrine malignancy. The thesis is focused on the study of genetic alterations and their phenotype manifestation in patients with medullary thyroid carcinoma (MTC) and Hirschsprung's disease (HSCR). In the pathogenesis of both diseases, mutations in the *RET* proto-oncogene play an important role – activating mutations in MTC, inactivating mutations in HSCR. However, there are also mutations with dual character (activating and inactivating) and patients with HSCR have increased risk for MTC development.

The large cohorts of patients and family members were collected and detailed clinical and pathological data have been correlated with detected genetic alterations. In our cohort of 490 patients with MTC and 381 of their at-risk relatives, a germline mutation was found in 60 patients and 73 family members, of which the majority had undergone prophylactic total thyroidectomy. The other 114 family members could be excluded from clinical screening due to the negative result of genetic testing. Identification of genetic changes in the *RET* proto-oncogene is essential not only for early therapeutic intervention in individuals at risk even in pre-symptomatic stage of the disease, but it helps to improve the diagnosis, and to estimate prognosis. Several unique case reports have been described within the genetic testing of families.

In sporadic MTC, somatic mutations in tumor tissue were detected of which Met918Thr was the most frequently represented and associated with worse clinical outcome and larger size of a tumor. We have published several case reports of priority with detected multiple mutations in a patient. The identification of a somatic mutation improves the diagnosis of sporadic MTC, when it is possible to completely disprove a hereditary form of MTC. The knowledge of a mutation has an important role also in prediction of disease development and progression and also in therapy with tyrosine kinase inhibitors in which the knowledge of a specific mutation is crucial for choosing of suitable treatment.

Screening of germline mutations in the *RET* proto-oncogene in all patients with HSCR is not worldwide a standard routine. Some centers perform routine screening of exon 10, but only in patients with a long form HSCR where the risk of MTC is higher. In our cohort of 214 patients with HSCR, germline mutation was detected in 28 patients, not only in exon 10, but often in other risk exons for MTC. Therefore we prefer sequencing of all seven risk exons in patients with all forms of HSCR and extend the analysis for the entire *RET* proto-oncogene in familial forms. Regarding novel mutations, we can not obviously conclude that they increase the risk for MTC, however, a patient should be followed up by an endocrinologist on the basis of a detected mutation. Moreover, an information about a mutation causing HSCR is also important for genetic counseling in families with HSCR and in future, it could be beneficial in preimplantation genetic diagnosis.

The linkage studies also in patients with no identified causative mutation indicate that the *RET* proto-oncogene is a major gene in the pathogenesis of both diseases. In the thesis, the role of polymorphisms as modifying factors involved in MTC and HSCR development and modulation was studied.

The results of the study of polymorphisms in patients with MTC show that variants in intronic regions of the *RET* proto-oncogene, especially in intron 1, can modify the disease. In rs1864410, rs2435357, rs2506004 (intron 1) and rs1800858 (exon 2) was observed a possible modifying effect in association with a worse disease progression - tumor size, presence of lymph node metastases, and disease recurrence. There was identified a risk haplotype TTAA consisting of minor alleles of these four polymorphisms.

Also in patients with HSCR, these polymorphisms seem to be crucial. Risk variants in intron 1 and haplotype with a high risk associated with HSCR were identified. Moreover, the association of the variants with aggressiveness of the disease and sex of patients were studied. Our findings that these markers carrying a high risk for HSCR are more often represented in males are consistent with the fact that HSCR occurs four times more often in males than females.

Our department is the only one in the Czech Republic that has established a routine genetic diagnosis of patients with MTC and HSCR. Currently, we are trying to clarify the genetic basis of several unsolved families with a clinically suspected hereditary form of MTC that have not a mutation in the entire *RET* proto-oncogene detected. Within the pilot study, several promising candidate genes and specific variants were identified using next generation sequencing method and the panel with more than 90 genes associated with a predisposition to cancer.

The outcome of the thesis is 18 publications covering our study of genetic causes in MTC and HSCR. The results of the study I presented in 22 lectures and posters discussed at international and domestic conferences. The thesis has contributed to obtain new scientific knowledge, to extend the molecular genetic diagnosis of MTC and HSCR in the Czech Republic and its results have become very beneficial to physicians, patients and their family members.

Použitá literatura / References

- Amiel J, Emison ES, Garcia-Barcelo M, et al.; Hirschsprung Disease Consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 2008; 45(1): 1-14.
- Avantaggiato V, Dathan NA, Grieco M, et al. Developmental expression of the *RET* proto-oncogene. *Cell Growth Differ* 1994; 5(3): 305-311.
- Beldjord C, Desclaux-Arramond F, Raffin-Sanson M, et al. *RET* protooncogene in sporadic pheochromocytomas: frequent MEN 2-like mutations and new molecular defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(7): 2063-2068.
- Berndt I, Reuter M, Saller B, et al. 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, et al. 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, et al. 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
- Burzynski GM, Nolte IM, Bronda A, et al. Identifying candidate Hirschsprung disease-associated *RET* variants. *Am J Hum Genet* 2005; 76(5): 850-858.
- Bütter A, Gagné J, Al-Jazaeri A, et al. 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.
- Ceolin L, Siqueira DR, Ferreira CV, et al. Additive effect of *RET* polymorphisms on sporadic medullary thyroid carcinoma susceptibility and tumor aggressiveness. *Eur J Endocrinol* 2012; 166(5): 847-854.
- Ciampi R, Mian C, Fugazzola L, et al. Evidence of a Low Prevalence of *RAS* Mutations in a Large Medullary Thyroid Cancer Series. *Thyroid* 2013; 23(1): 50-57.
- Crockett DK, Piccolo SR, Ridge PG, et al. Predicting Phenotypic Severity of Uncertain Gene Variants in the *RET* Prot-Oncogene. *PLoS One* 2011; 6(3): e18380. doi: 10.1371/journal.pone.0018380
- de Groot JW, Links TP, Plukker JT, et al. *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, et al. Mutations in the *RET* proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2(7): 851-856.
- Elisei R, Romei C, Cosci B, et al. *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, et al. 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.
- Erlic Z, Hoffmann MM, Sullivan M, et al. 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.
- Fitze G, Cramer J, Ziegler A, et al. 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, et al. *TTF-1* and *RET* promoter SNPs: regulation of *RET* transcription in Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14(2): 191-204.
- Griseri P, Lantieri F, Puppo F, et al. 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.
- Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, et al. 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.

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

Kjaer S, Kurokawa K, Perrinjaquet M, et al. 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, et al. Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009; 19(6): 565-612.

Lantieri F, Griseri P, Puppo F, et al. 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, et al. 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, et al. 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, et al. Polymorphisms in *RET* and its coreceptors and ligands as genetic modifiers of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Cancer Res* 2006; 66(2): 1177-1180.

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

Mathew CG, Chin KS, Easton DF, et al. 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, et al. 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, et al. Hirschsprungova choroba jako příčina chronické zácpy. *Pediatr pro Praxi* 2009; 10(4): 272-273.

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

Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, et al. Correlation of *RET* somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 2009; 100(11): 1777–1783.

Mulligan LM, Eng C, Attie T, 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, et al. Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363(6428): 458-460.

Nunez-Torres R, Fernandez RM, Acosta MJ, et al. 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, et al. The prevalence of somatic *RAS* mutations in medullary thyroid cancer – a Polish population study. *Endokrynol Pol* 2015; 66(2): 121-125.

Pakarinen MP, Rintala RJ, Koivusalo A, et al. 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, et al. *RET* 3'UTR polymorphisms and its protective role in Hirschsprung disease in southeastern Chinese. *J Pediatr Surg* 2012; 47(9): 1699-1705.

Pasini B, Hofstra RM, Yin L, et al. The physical map of the human *RET* proto-oncogene. *Oncogene* 1995; 11(9): 1737-1743.

Plaza-Menacho I, Koster R, van der Sloot AM, et al. *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.

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

- 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, et al. Activation of *RET* as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 1995; 267(5196): 381-383.
- Seri M, Yin L, Barone V, et al. Frequency of *RET* mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 1997; 9(3): 243-9.
- Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, et al. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* 1987; 328(6130): 528-530.
- Skinner MA, Moley JA, Dilley WG, et al. Prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med* 2005; 353(11): 1105-1113.
- So MT, Leon TY, Cheng G, et al. *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, et al. 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, et al. Variants in *RET* associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology* 2011; 140(2): 572-582.e2.
- 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, et al. 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, et al. 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.
- Vlček P, Neumann J. Karcinom štítné žlázy. Pooperační sledování nemocných. 1. vydání. Praha: Maxdorf 2002: 220. ISBN: 80-85912-50-3.

Seznam zkratek / Abbreviations

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

Curriculum vitae: Mgr. Eliška Václavíková

Narozena 11.1.1982 v Ostrově, okr. Karlovy Vary, svobodná

Vzdělání:

- 2006-2015 – doktorské studium, obor biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
téma výzkumu: Genetické příčiny medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby
- 2001-2006 – magisterské studium, obor biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
téma diplomové práce: RET proto-onkogen v patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby (vypracována na Oddělení molekulární endokrinologie v Endokrinologickém ústavu pod vedením doc. RNDr. Běly Bendlové, CSc.)
- 2013 – akreditovaný kvalifikační kurz Odborný pracovník v laboratorních metodách a v přípravě léčivých přípravků, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha
- 2008 – FCE, mezinárodní zkouška anglického jazyka Cambridge ESOL, British Council

Zaměstnání:

- od 2005 – Endokrinologický ústav Praha, odborný pracovník v laboratorních metodách (od 2013), přírodovědný analytik - diagnostik (2005-2013)
- 2004-2005 – Endokrinologický ústav Praha, Oddělení molekulární endokrinologie, praxe (bez úvazku)

Výzkumné zaměření:

- 2012-2015 spolupráce na grantovém projektu IGA MZ ČR NT13901-4 „Studium genetických změn u nádorů štítné žlázy“
- 2011-2014 spolupráce na grantovém projektu IGA MZ ČR NT/12336-4/2011 „Chromogranin, metanefriny a thyreoidální faktory v diferenciální diagnostice neuroendokrinních tumorů se zaměřením na medulární karcinom štítné žlázy a feochromocytom“
- 2011-2013 hlavní řešitelka grantového projektu GAUK 411611 „Studium genetických změn v RET proto-onkogenu u pacientů s Hirschsprungovou chorobou“
- 2008-2011 spolupráce na grantovém projektu CZ0123 „Incidence of metabolic syndrome - its prevention by timely diagnostics and treatment of child obesity“; podpořen grantem z Norska prostřednictvím Norského finančního mechanismu - projekt COPAT (Childhood Obesity Prevalence And Treatment)
- 2007-2009 spolupráce na grantovém projektu IGA MZ ČR NR/9165-3 - „Hlavní genetické příčiny a modifikační faktory v patogenezi nádorů štítné žlázy“
- 2006-2008 spolupráce na grantovém projektu GAČR 301/06/P425 - „Genetický screening pacientů s Hirschsprungovou chorobou v České republice“
- 2005-2007 spolupráce na grantovém projektu IGA MZ ČR NR/8519-3 - „Proteomická analýza buněk feochromocytomu“
- 2004-2006 spolupráce na grantovém projektu IGA MZ ČR NR/7806-3 - „RET proto-onkogen v patogenezi medulárního a papilárního karcinomu štítné žlázy v české populaci“ (Čestné uznání MZ ČR)

Odborné kurzy:

- „Seminář uživatelů genetických analyzátorů CEQ / GEXP“, organizovaný firmou Beckman Coulter, 23. května 2013, Praha
- „Illumina Group User Meeting“, výcvikový kurz pro uživatele sekvenátoru příští generace, organizovaný firmou Illumina, 17.-18. října 2011, Nice, Francie
- „Analýza kategoriálních dat“, pořádaný firmou StatSoft, 5. listopadu 2010, Praha
- „Pokročilé ovládání programu Statistica“, pořádaný firmou StatSoft, 5. října 2010, Praha
- „Základní statistické postupy v biomedicíně“, pořádaný v Endokrinologickém ústavu Praha, 13.-17. září 2010, Praha. Vedoucí a lektor kurzu - Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.
- „Kurz FCE 60“, pořádaný společností Tutor, s.r.o., 4. února - 28. května 2008, Praha
- „Základy statistiky pro biomedicínu a zdravotnictví“, pořádaný Oddělením medicínské informatiky ÚI AV ČR, 4. - 18. října 2006, Praha. Garant kurzu - Prof. RNDr. Jana Zvárová, DrSc.
- „Výcvikový kurz pro uživatele 8-kapilárového automatického sekvenátoru CEQ 8000“, organizovaný firmou Beckmann Coulter, 23. - 26. ledna 2006, High Wycomb, UK

Členství:

člen České endokrinologické společnosti ČLS JEP

člen European Thyroid Association

člen European Society of Endocrinology

Ceny:

- Cena České endokrinologické společnosti za nejlepší publikaci roku 2012 (Vaclavikova E et al. *Pediatr Surg Int* 2012; 28(2): 123–8.)
- Aesculab Prize – 2. místo – udělené na 24th International Symposium on Pediatric Surgical Research, Graz, 8-10 September 2011 za přednášku „Hirschsprung’s disease and medullary thyroid carcinoma – 15-year experience with molecular genetic screening of the *RET* proto-oncogene“
- Cena České endokrinologické společnosti za nejlepší publikaci roku 2009 (Vaclavikova E et al. *Endocrine* 2009, 36(3), 419-424.)

Autorka a spoluautorka 21 publikací (H-index = 6).

Autorka a spoluautorka 43 prezentací/posterů na zahraničních konferencích.

Autorka a spoluautorka 27 prezentací/posterů na tuzemských konferencích.

Curriculum vitae: Eliska Vaclavikova, M.S.

Date of birth: January 11, 1982 in Ostrov, Czech Republic

Education:

- 2006-2015 – PhD. study of Biochemistry, Charles University, Faculty of Science, Prague
research thema: Genetické příčiny medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby
- 2001-2006 – M.S. study of Biochemistry, Charles University, Faculty of Science, Prague
diploma thesis: *RET proto-oncogene in the pathogenesis of medullary carcinoma and Hirschsprung disease* (was processed in the Institute of Endocrinology in Prague, Dpt. of Molecular Endocrinology, under leading of doc. RNDr. Bela Bendlova, CSc.)
- 2013 – accredited qualification course Specialist in laboratory techniques, Institute of Postgraduate Medical Education, Prague
- 2008 – FCE, First Certificate in English, Cambridge ESOL, British Council

Employment:

- since 2005 – Institute of Endocrinology in Prague, Specialist in laboratory techniques (since 2013), analyst - diagnostician (2005-2013)
- 2004-2005 – Institute of Endocrinology in Prague, Dpt. of Molecular Endocrinology, practise

Research experience:

- 2012-2015 participation in the grant project IGA MZ ČR NT13901-4 “Study of the Genetic Alterations in Thyroid Cancer“
- 2011-2014 participation in the grant project IGA MZ ČR NT/12336-4/2011 “Chromogranin, metanephrines and thyroid factors in the differential diagnosis of neuroendocrine tumors directed to the medullary carcinoma of the thyroid gland and pheochromocytoma“
- 2011-2013 chief investigator of the grant project GAUK 411611 “The Study of genetic changes in the *RET* proto-oncogene in patients with Hirschsprung’s disease“
- 2008-2011 participation in the grant project CZ0123 “Incidence of metabolic syndrome - its prevention by timely diagnostics and treatment of child obesity“; supported by Norway grants - project COPAT (Childhood Obesity Prevalence And Treatment)
- 2007-2009 participation in the grant project IGA MZ ČR NR/9165-3 - “Main genetic causes and their modifiers in the pathogenesis of thyroid tumors“
- 2006-2008 participation in the grant project GAČR 301/06/P425 - “Genetic screening of patients with Hirschsprung’s disease in the Czech republic“
- 2005-2007 participation in the grant project IGA MZ ČR NR/8519-3 - “Proteomic analysis of pheochromocytoma cells“
- 2004-2006 participation in the grant project IGA MZ ČR NR/7806-3 - “*RET* proto-oncogene in the pathogenesis of medullary and papillary thyroid carcinoma in Czech population“ (awarded by the Ministry of Health of the Czech Republic - certificate of merit)

Odborné kurzy:

- “Seminar for users of genetic analyzer CEQ/GEXP”, organized by Beckman Coulter, 23 May 2013, Prague
- “Illumina Group User Meeting”, training course for users of next generation sequencing machine, organized by Illumina UK Ltd., 17-18 October 2011, Nice, France
- “Categorical Data Analysis”, organized by Statsoft, 5 November 2010, Prague
- “Introduction to Statistica”, organized by Statsoft, 5 October 2010, Prague
- “Course of Biomedical Statistics”, organized by the Institute of Endocrinology, 13-17 September 2010, Prague. Lecturer: Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.
- “Course for FCE 60”, organized by the Tutor, February 4 – May 28 2008, Prague
- "Course of biomedical statistics", organized by the Centre of Biomedical Informatics of the Institute of Computer Science AS CR, 4-18 October 2006, Prague
- "Training course for CEQ 8000 Sequencer user", organized by Beckmann Coulter, 23-26 January 2006, High Wycombe, UK

Membership:

member of the Czech Endocrinological Society

member of the European Thyroid Association

member of the European Society of Endocrinology

Awards:

- The Award of the Czech Endocrinological Society for the best publication in 2012 (Vaclavikova E et al. *Pediatr Surg Int* 2012; 28(2): 123–8.)
- Aesculab Prize – 2nd prize awarded for work entitled “*Hirschsprung’s disease and medullary thyroid carcinoma – 15-year experience with molecular genetic screening of the RET proto-oncogene*” on the 24th International Symposium on Pediatric Surgical Research, Graz, 8-10 September 2011
- The Award of the Czech Endocrinological Society for the best publication in 2009 (Vaclavikova E et al. *Endocrine* 2009, vol. 36(3), 419-424.)

Author and co-author of 21 publications (H-index = 6).

Author and co-author of 43 presentations/posters on international conferences.

Author and co-author of 27 presentations/posters on domestic conferences.

Publikační a prezentační činnost / Publications and presentations of the author

Publikační činnost / Publications of the author

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 neoplázie 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 / Presentations of the author

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 (přenáška)

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 dny, 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)