

## Oponentský posudek

doktorské dizertační práce Mgr. Elišky Václavíkové

### Genetické příčiny medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschprungovy choroby

Práce je zaměřena na studium molekulárně genetických příčin dvou jednoduchých neurokristopatií - medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC) a Hirschprungovy choroby, okrajově jsou popsány i komplexní neurokristopatie - mnohočetná endokrinní neoplázie typu 2A a 2B. Řešená problematika má velký význam pro pochopení molekulární podstaty studovaných onemocnění a má nezanedbatelné praktické dopady pro diagnostickou praxi. Důležitost řešené problematiky je také podpořena skutečností, že karcinomy štítné žlázy představují nejčastější onkologické onemocnění v endokrinologii. Práce je věnována zejména analýze genetických variant v *RET* proto-onkogenu, který hraje v patogenezi výše zmíněných onemocnění významnou roli.

#### Cíl dizertační práce

Cílem práce byla detekce hlavních genetických aberací v *RET* proto-onkogenu, studium polymorfismů jako modifikujících faktorů v patogenezi onemocnění a studium vztahu mezi genetickými změnami a jejich fenotypovými projevy u pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy a Hirschprungovou chorobou.

#### Forma a rozsah práce

Dizertace je vypracována v českém jazyce, má logickou stavbu, je přehledná a srozumitelná. Teoretická část představuje ucelený přehled současných znalostí, popisuje klinické, diagnostické a terapeutické aspekty studovaných onemocnění, vysvětluje molekulárně genetické příčiny vzniku a progresu onemocnění. K teoretické části se vztahuje šest příložených souhrnných článků publikovaných v českých odborných časopisech. Výsledková část, jejímž jádrem je 10 publikací, je přehledně členěna do pěti podkapitol věnujícím se detekci zárodečných mutací a studiu polymorfismů v *RET* proto-onkogenu u pacientů s MTC a Hirschprungovou chorobou, jedna kapitola je věnována detekci somatických mutací u pacientů s MTC. V každé kapitole jsou stručně shrnuty dosažené výsledky, na které navazuje diskuze a komentáře k publikacím vztahujícím se k danému tématu.

Celkově je podkladem dizertační práce úctyhodných 16 publikací, z nichž 9 je uveřejněno v mezinárodních časopisech. Uchazečka je první autorkou ve třech publikacích s IF.

#### Hodnocení postupu, metodik a výsledků

Molekulárně genetická analýza byla provedena u několika set dobře klinicky charakterizovaných pacientů a jejich rodinných příslušníků, ke studiu polymorfismů sloužilo též 205 vzorků kontrolního souboru.

K analýze mutací v *RET* proto-onkogenu byla použita jak Sangerova sekvenační analýza tak analýza využívající sekvenování nové generace. Varianty nejasného významu byly testovány *in silico* pomocí tří volně dostupných predikčních programů. Pro vyšetření polymorfismů byla použita metoda real-time PCR s použitím TaqMan sond, získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny. Použité postupy hodnotím jako vhodné k dosažení vytyčených cílů.

Hlavní přínos práce spatřuji ve vyšetření rozsáhlých skupin pacientů, které vedlo k identifikaci známých i nových variant v *RET* proto-onkogenu u desítek pacientů. Získané výsledky rozšiřují poznatky o molekulární podstatě onemocnění a přispívají k systému klasifikace mutací dle jejich rizikovosti. Dalším přínosem práce je studium polymorfismů v

*RET* proto-onkogenu, které vyústilo v identifikaci několika potenciálních rizikových a protektivních variant.

Práce má velký význam v oblasti diagnostické. Rozsáhlá analýza variant identifikovaných u českých pacientů v porovnání s údaji publikovanými ve světové literatuře umožňuje predikci dalšího průběhu onemocnění u pacientů a návrh profylaktické péče u rodinných příslušníků. Velmi cennou součástí práce je kritický popis problémů, které molekulárně genetická analýza přináší. Jsou například diskutovány dvě kontroverzní varianty (p.Tyr791Phe a p.Ser649Leu), u kterých není zřejmá jejich patogenita. Přitom, jak bylo zmíněno výše, je interpretace patogenity mutace zásadní informací v rozhodování lékařů o péči o pacienty i jejich rodiny.

### **Komentáře a dotazy**

- Obrázky 8, 10 a 11 by si pro lepší srozumitelnost zasloužily podrobnější legendu, např. u obr. 8 není uvedeno zvětšení a způsob barvení. U obrázků 8 a 10 není zřejmé, zda se jedná o snímky pořízené na pracovišti nebo převzaté z literatury.
- V metodické části v Tabulce 6 by bylo vhodné doplnit délky PCR produktů.
- V metodické části na straně 42 autorka popisuje sekvenační reakci: „Jedná se také o PCR, již se kromě nukleotidů účastní i menší část fluorescenčně značených dideoxynukleotidů“. Pro vysvětlení principu sekvenační reakce považuji za důležité zdůraznit nejen účast dideoxynukleotidů, ale také přítomnost pouze jednoho primeru.
- V dizertační práci i v Příloze 10 je zmíněna sekvenační analýza z FFPE vzorků (formalin-fixed paraffin-embedded sample), výsledky však nejsou dokumentovány. Analýza těchto vzorků bývá problematická, protože formalin degraduje DNA. Jak jste v tomto případě postupovali? Byly použity kratší PCR produkty? Jaká byla kvalita sekvenování?
- Z porovnání tabulek 7 a 9 vyplývá, že sekvence primerů pro PCR a sekvenování jsou v některých případech odlišné. Jaký je k tomu důvod?
- Práce dokládá, že sekvenování nové generace je velmi prospěšná metoda při analýze somatických mutací, protože dokáže zachytit i poměrně malé procento mutovaných alel. V práci je uveden příklad, kdy mutovaná alela byla detekována pouze v 7% osekvenovaných fragmentů. Jaká byla hloubka čtení? Je plánována revize dostupných vzorků metodou NGS?

### **Závěr**

Dizertační práce významně přispívá k problematice častých endokrinních onemocnění a ukazuje přínos i úskalí molekulárně genetické diagnostiky těchto onemocnění. Práce splňuje vytčené cíle, využívá moderní metody molekulárně genetické diagnostiky a přináší nové poznatky, které prošly kritickým hodnocením v impaktovaných časopisech. Uchazečka prokázala, že má v dané problematice hluboké teoretické znalosti, je schopná publikovat výsledky své práce a prezentovat je na domácích i zahraničních konferencích. Předkládaná dizertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvůrčí vědecké práci.

Na základě výše uvedených skutečností doporučuji dizertační práci k obhajobě a na jejím základě navrhuji **udělit Mgr. Elišce Václavíkové akademický titul „philosophiae doctor“ (Ph.D.)**.

RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.

Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF UK a VFN, Praha

V Praze dne 24. 8. 2015