

Posudek disertační práce

Autor disertační práce: Peter Vasovčák

Název disertační práce: Vplyv variant v génoch asociovaných s kancerogénou na predispozíciu a fenotyp hereditárnych a sporadických nádorových ochorení gastrointestinálneho traktu.

Oponent: MUDr. Pavlína Plevová, Ph.D.

Obecný posudek:

Autor předkládá vysoce kvalitní disertační práci, která se týká problematiky molekulárně genetické detekce konkrétních zárodečných genetických změn, které představují vysoké dědičné riziko vzniku polypózy a nádorových onemocnění trávicího traktu, a dále somatických genetických změn vznikajících v nádorových tkáních sporadických karcinomů kolorekta.

Práce je podložen třemi již publikovanými pracemi v kvalitních zahraničních časopisech a dvěma rukopisy připravenými k publikaci.

Dvě práce pojednávají o kazuistikách konkrétních pacientů se syndromem Cowdenové, u nichž byla potvrzena diagnóza na molekulární úrovni nálezem zárodečné mutace v genu *PTEN*. Třetí práce se týká molekulárně genetické diagnostiky Peutz-Jeghersova syndromu, tedy detekcí zárodečných mutací v genu *STK11*. Nálezy v těchto pracích přispívají k charakterizaci klinického obrazu těchto onemocnění. Je nutné také vyzdvihnout, že zavedení molekulárně genetické diagnostiky těchto dvou genů má význam nejen výzkumný, ale také zcela zásadní význam pro klinickou praxi.

Experimentální práce týkající se detekce somatických mutací celé řady genů ve tkáních sporadických karcinomů kolorekta přináší nová zajímavá data do této problematiky.

V páté publikaci je prezentován případ pacientky s bialelickou zárodečnou mutací genu *PMS2*, u níž byla provedena podrobná analýza mnoha genů v nádorové tkáni a charakter zjištěných mutací v konkrétních genech vedl k vytipování a analýze genů, jejichž vyřazení by mohlo být příčinou těchto genetických změn. Tak byla zjištěna sekundární mutace v genu *TDG*, která vedla terciálně k typickým mutacím v nádorové tkáni. Tyto nálezy jsou zcela unikátní.

Všechna řešená témata jsou aktuální. Soubory pacientů a materiálu jsou jasně definovány a sledované cíle jasně stanoveny. Autor používá adekvátní metody laboratorních analýz v širokém rozsahu a vyčerpávajícím způsobem s ohledem na současné možnosti. Po formální stránce je práce bez výhrad.

Konkrétní připomínky a dotazy:

Úvod, str. 13, graf 1: V grafu je omylem u předposlední položky „karcinom štítné žlázy“ uveden počet případů týkající se poslední položky „jiné maligní nádory“, obdobně u žen je u karcinomu laryngu uveden počet pro jiné maligní nádory.

Publikace 1 a 2: Byli v těchto rodinách vyšetřeni další rodinní příslušníci (i v širší rodině)? Je možné usuzovat, zda se jednalo o familiární mutace či o mutace vzniklé „*de novo*“?

Publikace 1 a 2: Z obou publikací je velmi poučné, že polypy v tlustém střevě nebyly charakterem hamartomy. V této souvislosti se nabízí otázka, zda by mělo být v kritériích pro Cowdenův syndrom vůbec trváno na tom, že polypy jsou charakteru hamatomů?

Publikace 3: Existuje hypotéza, která by vysvětlovala, proč právě mukokutánní hyperpigmentace a tvorba hamatomů jsou typickým důsledkem mutací genu *STK11*?

Publikace 4, „Materials and Methods“, str. 49 odstavec 3, str.52 odstavec 1 a „Results“, str. 52, odstavec 3: Jsou uvedeny odkazy na detaily stran charakteristik pacientů a výsledků analýz LOH, MSI, DNA metylace a IHC v tabulce S1, tato však v rukopise chybí.

Publikace 4, „Results“, str. 54, odstavec 4: Oddíl s názvem „Correlation of molecular findings with clinical and IHC data“ patrně omylem neobsahuje údaje týkající se imunohistochemických analýz. Výsledky IHC nejsou také diskutovány. Zajímalo by mě, jaká byla korelace imunohistochemických nálezů s analýzou MSI.

Publikace 4, „Results“, str.55, odstavec 3: Průměrný věk pacientů s MSI nádory bez metylace promotoru *MLH1* byl 58,2 let a s metylací 64 let. Chtěla bych se zeptat, jaké je rozmezí věku těchto pacientů. V literatuře bylo publikováno, že mezi nádorovými onemocněními kolorekta ve vysokém věku je relativně vysoké zastoupení nádorů s MSI.

Publikace 4, Discussion, str. 57, odstavec 2: Autor uvádí, že IHC byla provedena jen pro proteiny *MLH1* a *MSH2* a že nelze vyloučit ztrátu exprese proteinů *MSH6* a *PMS2*. S tímto lze samozřejmě souhlasit, avšak i tak mají obecně výsledky vyšetření těchto 2 proteinů poměrně vysokou výpovědní hodnotu, neboť proteiny *MLH1* a *PMS2* a proteiny *MSH2* a *MSH6* tvoří dimer a pokud je mutovaný jeden z dvojice genů, dochází ve většině případů k současné ztrátě obou proteinů v nádorové tkáni. Toto platí zejména pro mutace genu *MLH1*, které vedou současně ke ztrátě exprese proteinu *PMS2*, a genů *MSH2* a *MSH6* navzájem. V případě mutací genu *PMS2* dochází ke konkordantní ztrátě proteinu *MLH1* asi v 1/3 – 1/2 případů (v souladu s tímto jsou také nálezy v publikaci 5).

Publikace 4, „Discussion“, str. 59, odstavec 3: Autor uvádí, že ačkoli nemůže vyloučit možnost, že mezi 13 MSI nádory bez metylace promotoru *MLH1* jsou pacienti s Lynchovým syndromem, selekční kritéria a relativně nízké zastoupení Lynchovských tumorů mezi neselektovanými kolorektálními karcinomy pro toto nesvědčí. Průměrný věk těchto pacientů byl 58,2 let („Results“, str.55, odstavec 3). Chtěla bych se zeptat, jestli přece jen autor neuvažuje o vyšetření genů *MLH1* a *MSH2* u těch pacientů, jejichž věk by byl pod 50 let v souladu s kritérii s Bethesda? Kolik takových pacientů v této skupině bylo?

Publikace 4, „Discussion“, str. 59, odstavec 4: Autor cituje větu: „It has been shown that a single CRC can harbour up to 76 point mutations and 9 copy number changes, and that rather whole pathways than individual genes govern the process of carcinogenesis [50, 51].“ Dle mého názoru somatické mutace vznikající v nádorové tkáni nelze považovat paušálně za hybnou sílu progresu nádorového onemocnění. Některé mutace nebo LOH budou v procesu kancerogeneze kritické. Avšak myslím si, že od určité fáze nádorového onemocnění velká část mutací a chromozomálních změn vzniká v rámci chaotické replikace nádorových buněk postrádajících kontrolní mechanismy a nemusí se nutně podílet na progresi nádorového onemocnění, prostě vznikne, aniž by měla nějaký biologický význam. Toto by snad mohla podporovat i data uvedená v tabulce 1 na str. 65. Pokud by totiž všechny mutace měly být hybnou silou růstu nádoru, dalo by se očekávat, že u vyšších stádií nádoru bude zastoupení

mutací vyšší, pro což data v této tabulce nesvědčí. Kromě toho nádorová tkáň je vysoce heterogenní, takže mutace, které jsou detekovány, nemusí být v celé nádorové populaci, ale pouze v jejích některých částech.

Publikace 5: Výsledky týkající se somatické mutace genu *TDG* vzniklé sekundárně v důsledku bialelické zárodečné mutace genu *PMS2* a v důsledku mutace genu *TDG* pravděpodobně terciálně vzniklé mutace v genech *APC* a *CTNNB1* jsou velmi zajímavá a zásadní. V literatuře nic obdobného publikováno nebylo. Co se týče genu *TDG*, nebylo dosud popsáno, jaké důsledky mají u člověka zárodečné mutace genu *TDG*. Myši s vyřazenými oběma alelami genu *TDG* nejsou životaschopné. V souvislosti s výsledky v této publikaci se nabízí, zda by zárodečné mutace genu *TDG* v heterozygotním stavu nemohly predisponovat ke vzniku nádorových onemocnění, ať již kolorekta či jiných. Existuje práce, v níž byla v souboru 96 pacientů s kolorektálním karcinomem nalezena jedna zárodečná missense varianta genu *TDG* (Broderick P, et al., BMC Cancer 2006;6:243), avšak jednoznačný závěr z tohoto nálezu udělat nelze a další práce k této problematice nebyly publikovány.

Publikace 5, „Results“, str. 73, odstavec 5: V práci je uvedeno, že rodinná anamnéza pacientky je negativní. Jsou dostupné údaje o širší rodině stran výskytu nádorových onemocnění? Dalo by se očekávat, že alespoň u prarodičů se vyskytnou nádorová onemocnění typická pro HNPCC.

Publikace 5, „Results“, str. 73, odstavec 5: Je uvedeno, že pacienti s konstitučním deficitem systému oprav chybného párování bází (CMMR-D) jsou velmi často nosiči bialelické mutace v genu *PMS2*. Dalo by se předpokládat, že vzhledem k tomu, že nejčastěji je HNPCC podmíněn mutacemi genů *MLH1* a *MSH2*, bude s ohledem na výskyt mutací v populaci také bialelická mutace těchto genů nejčastější příčinou CMMR-D. Jak je vysvětlován častý výskyt bialelických mutací genu *PMS2* u syndromu CMMR-D? Bylo popsáno, že mutace na jedné alele vznikne „de novo“?

Publikace 5, „Discussion“, str. 78, odstavec 2. Autor uvádí, že u pacientů s Lynchovým syndromem nebývají přítomny polypy, zatímco u syndromu CMMR-D byly polypy opakovaně popsány. V této souvislosti lze podotknout, že ačkoli nepříliš často, i u klasického Lynchova syndromu se lze setkat s tvorbou mnohočetných polypů.

Závěr:

Předložená disertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci a proto ji doporučuji ji k obhajobě a po úspěšné obhajobě k udělení titulu „Ph.D.“.

V Ostravě, dne 1.9.2011