

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Sledování změn metylace DNA jako prognostických biomarkerů u karcinomu  
děložního čípku

Diplomová práce

Bc. Kristýna Růžičková

2022

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Růžičková**  
Osobní číslo: **C20458**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Sledování změn metylace DNA jako prognostických biomarkerů u karcinomu děložního čípku**  
Téma práce anglicky: **Monitoring Of Changes In DNA Methylation As Prognostic Biomarkers In Cervical Cancer**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

- Karcinom děložního čípku
- Epigenetika – podrobněji metylace DNA
- Molekulární a epigenetické markery karcinomu děložního čípku
- HPV infekce

### Experimentální část:

- Zpracování a vyhodnocení TCGA dat
- Izolace genomové DNA ze vzorků tkání fixovaných ve formalínu uložených v parafínu
- Kontrola kvality a koncentrace DNA
- Bisulfidová konverze DNA
- Návrh specifických PCR primerů (podle výsledků ze zpracování TCGA dat)
- Polymerázová řetězová reakce (PCR), kvantitativní PCR (qPCR)
- Zpracování dat a statistická analýza

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Ing. Helena Kovaříková, Ph.D.**  
Fakultní nemocnice Hradec Králové, Ústav klinické  
biochemie a diagnostiky

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Sledování změn metylace DNA jako prognostických biomarkerů u karcinomu děložního čípku jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

Bc. Kristýna Růžičková

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce paní Mgr. Barboře Jankovičové, Ph.D. za věcné připomínky a cenné rady, které mi v průběhu zpracování této práce věnovala. Můj velký dík patří také paní Ing. Heleně Kovaříkové, Ph.D. za předání zkušeností, za odborné vedení a rady při konzultacích. Stejně tak děkuji kolektivu Ústavu klinické biochemie a diagnostiky za ochotu vždy mi pomoci. V neposlední řadě děkuji mé rodině za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Cílem této diplomové práce je nalezení potenciálních diagnostických a prognostických markerů pro karcinom děložního čípku založený na analýze metylace DNA s možností vyšetřovat je za použití neinvazivních metod. Teoretická část práce představuje problematiku karcinomu děložního čípku. Následuje shrnutí jednotlivých epigenetických mechanismů s podrobnějším popisem metylace DNA a jejího významu v karcinogenezi. Na konci této části je zmíněn přehled molekulárních a epigenetických biomarkerů pro karcinom děložního čípku.

V experimentální části, která probíhala v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, jsme si nejprve navrhli primery pro geny zvolené na základě literární rešerše. Optimalizovali jsme metody kvantitativní PCR (qPCR) a metylačně-specifickou analýzu křivek tání s vysokým rozlišením (MS-HRM), které jsme použili pro posouzení rozsahu metylace vybraných genů u našich vzorků. Jednalo se o vzorky odebrané z děložního čípku s nádorovým bujením a nenádorové kontrolní vzorky bez diagnózy nádorového bujení.

V závěru práce je na základě statistické analýzy dat uvedena korelace vybraných genů se zaznamenanými klinicko-patologickými charakteristikami karcinomu děložního čípku.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

epigenetika, DNA metylace, karcinom děložního čípku, biomarkery

**TITLE**

Monitoring of changes in DNA methylation as prognostic biomarkers in cervical cancer

**ANNOTATION**

The diploma thesis is devoted to finding potential diagnostic and prognostic markers for cervical cancer, which would be based on DNA methylation analysis and could be investigated using non-invasive methods. The experimental part of the diploma thesis took place at the Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics in Hradec Králové.

The theoretical part of the work presents the topic of cervical cancer. The following is an introduction to individual epigenetic mechanisms with a more detailed description of DNA methylation and its importance in carcinogenesis. An overview of molecular and epigenetic biomarkers for cervical cancer is mentioned at the end of this section.

In the experimental part, we designed primers for genes selected based on a literature search. We optimized quantitative PCR (qPCR) methods and high-resolution methylation-specific melting curve (MS-HRM) analysis, which we used to determine the extent of methylation of selected genes in our samples. These samples were taken from the cervix with tumor growth and non-tumor control samples without a malignant diagnosis.

At the end of the work, the correlation of selected genes with the recorded clinicopathological characteristics of cervical cancer is presented.

**KEYWORDS**

epigenetics, DNA methylation, cervical cancer, biomarkers

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK .....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	12
ÚVOD.....	15
1    TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1.1    Děložní čípek .....	16
1.2    Karcinom děložního čípku.....	18
1.2.1    Epidemiologie .....	20
1.2.2    Etiopatogeneze – HPV infekce.....	21
1.2.3    Screening a diagnostika .....	23
1.2.4    TMN klasifikace a FIGO klasifikace.....	24
1.2.5    Léčba.....	25
1.2.6    Prevence .....	26
1.3    Epigenetika .....	27
1.3.1    Metylace DNA .....	27
1.3.2    Modifikace histonů .....	33
1.3.3    RNA interference (RNAi).....	34
1.4    Molekulární a epigenetické markery karcinomu děložního čípku.....	35
1.4.1    Nádorové markery v klinickém použití .....	35
1.4.2    Molekulární markery .....	36
1.4.3    Epigenetické markery .....	38
2    CÍL PRÁCE.....	39
3    EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	40
3.1    Materiál a zařízení.....	40
3.1.1    Biologický materiál .....	40
3.1.2    Kity .....	42
3.1.3    Chemikálie .....	42
3.1.4    Laboratorní pomůcky a přístroje .....	42
3.2    Metodika.....	43
3.2.1    Zpracování a vyhodnocení TCGA dat.....	43
3.2.2    Izolace DNA z parafínu .....	43
3.2.3    Kontrola čistoty a kvality DNA.....	45
3.2.4    Bisulfitová konverze DNA.....	46



3.2.5	Navržení a syntéza specifických PCR primerů .....	48
3.2.6	Optimalizace real-time PCR.....	49
3.2.7	Kvantitativní PCR pro detekci metylace.....	52
3.3	Zpracování dat a statistická analýza.....	54
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	55
4.1	Výsledek optimalizace PCR .....	57
4.2	Výsledek MS-HRM analýzy.....	59
4.3	Korelace s klinicko-patologickými daty.....	61
5	ZÁVĚR .....	68
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	69
7	PŘÍLOHY .....	79

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1:</b> Ženské pohlavní ústrojí.....	16
<b>Obrázek 2:</b> Histologický řez děložním hrdlem s jednotlivými anatomickými oddíly .....	17
<b>Obrázek 3:</b> A. Skvamokolumnární junkce B. Cervikální intraepiteliální neoplázie, dle rozsahu postižení epitelu .....	19
<b>Obrázek 4:</b> Srovnání incidence karcinomu děložního čípku v ČR s ostatními zeměmi Evropy .....	20
<b>Obrázek 5:</b> Incidence a mortalita karcinomu děložního čípku v České republice: přepočty na 100 000 žen.....	21
<b>Obrázek 6:</b> Schématické zobrazení polohy jednotlivých genů v rámci kruhového genomu HPV 16 .....	22
<b>Obrázek 7:</b> Metylace DNA.....	29
<b>Obrázek 8:</b> A. Bisulfitová přeměna B. Primární sekvence po bisulfitové konverzi.....	32
<b>Obrázek 9:</b> Schéma kolonkové metody k izolaci DNA .....	45
<b>Obrázek 10:</b> Znázorněna metylace genu <i>ASCL1</i> v jeho promotorové oblasti.....	56
<b>Obrázek 11:</b> Znázorněna metylace genu <i>SLIT2</i> v jeho promotorové oblasti.....	56
<b>Obrázek 12:</b> Výsledek teplotní gradientové PCR vizualizovaný na agarózovém gelu.....	58
<b>Obrázek 13:</b> Amplifikační křivka (A) a křivka tání (B) a pík první deprivatizace křivky tání při ideálním průběhu amplifikace u optimalizovaného amplikonu <i>ASCL1_1</i> .....	58
<b>Obrázek 14:</b> Reprezentativní grafy z MS-HRM amplikonu <i>ASCL1_1</i> .....	59
<b>Tabulka 1:</b> Karcinom děložního čípku - klasifikace TNM (8. vydání, 2017) a FIGO (revize 2018).....	25
<b>Tabulka 2:</b> Metylační markery pro karcinom děložního čípku .....	38
<b>Tabulka 3:</b> Histonové modifikační markery pro rakovinu děložního čípku .....	38
<b>Tabulka 4:</b> Klinicko-patologická data zahrnutých pacientek s karcinomem děložního čípku	41
<b>Tabulka 5:</b> Teplotní profil pro bisulfitovou koverzi .....	47
<b>Tabulka 6:</b> Parametry navržených primerů pro jednotlivé geny .....	49
<b>Tabulka 7:</b> Složení směsí pro přípravu real-time PCR s použitím Master Mixu Top Bio, BC DNA – bisulfiticky konvertovaná DNA, CC - karcinom děložního čípku .....	50
<b>Tabulka 8:</b> Teplotní profil PCR při optimalizaci nasedání primerů za použití Master Mixu Top Bio .....	50

<b>Tabulka 9:</b> Složení směsi pro přípravu real-time PCR s použitím Master Mixu Generi, BC DNA – bisulfiticky konvertovaná DNA, CC - karcinom děložního čípku .....	50
<b>Tabulka 10:</b> Teplotní profil PCR při optimalizaci nasedání primerů za použití Master Mixu Generi .....	51
<b>Tabulka 11:</b> Složení směsi pro přípravu real-time PCR s použitím Master Mixu Gold, BC DNA – bisulfiticky konvertovaná DNA .....	51
<b>Tabulka 12:</b> Teplotní profil PCR při optimalizaci nasedání primerů za použití Master Mixu Gold .....	52
<b>Tabulka 13:</b> Reagencie při MS-HRM pro amplikon ASCL1_1 .....	53
<b>Tabulka 14:</b> Teplotní profil pro amplikon ASCL1_1 .....	53
<b>Tabulka 15:</b> Reagencie při MS-HRM pro amplikon ASCL1_2 .....	53
<b>Tabulka 16:</b> Teplotní profil pro amplikon ASCL1_2 .....	54
<b>Tabulka 17:</b> Geny s prokázanou metylací v promotorové oblasti .....	55
<b>Tabulka 18:</b> Stupeň metylace v jednotlivých kategoriích u amplikonu ASCL1_1 .....	60
<b>Tabulka 19:</b> Stupeň metylace v jednotlivých kategoriích u amplikonu ASCL1_2 .....	61
<b>Tabulka 20:</b> Klinicko-patologická data porovnána s procentem (%) metylovaných vzorků u amplikonu ASCL1_1 .....	63
<b>Tabulka 21:</b> Klinicko-patologická data porovnána s procentem (%) metylovaných vzorků u amplikonu ASCL1_2 .....	64

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADC	Adenokarcinomy (z angl. Adenocarcinoma)
ASC	Adenoskvamózní karcinom (z angl. adenosquamous carcinoma)
ASCL1	Achatový scute homolog 1 (z angl. achaete-scute homolog 1)
Bcl-2	Buněčný B-lymfom 2 (z angl. B-cell lymphoma 2)
Brn-3A	Mozkový specifický homeoboxový/POU doménový protein 3A (z angl. brain-specific homeobox/POU domain protein 3A)
CIN	Cervikální intraepiteliální neoplazie (z angl. cervical intra-epithelial neoplasia)
CpG	Cytosin-fosfát-Guanin (z angl. cytosine-phosphate-guanine)
cTNM	Klinická klasifikace TNM (z angl. clinical TNM)
CYFRA 21-1	Fragmenty cytokeratinu 19
DICER	Endonukleáza DICER (z angl. endoribonuclease DICER)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DNMT	DNA metyltransferáza (z angl. DNA methyltransferase)
DNMT1	DNA-(cytosin-5)-metyltransferáza 1
DNMT3	DNA-(cytosin-5)-metyltransferáza 3
dsRNA	Dvouvláknová ribonukleová kyselina (z angl. double-stranded RNA)
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor receptor)
ELISA	Enzymová imunoanalýza (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EMT	Epiteliálně-mezenchymální tranzice
FFPE	Fixované formalínem a zalité v parafínu (z angl. formalin-fixed paraffin-embedded)
FIGO	Mezinárodní federace gynekologů a porodníků (z angl. The International Federation of Gynecology and Obstetrics)
G-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů (z angl. granulocyte colony-stimulating factor)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
HPV	Lidský papilomavir (z angl. human papillomavirus)
HR-HPV	Vysoce rizikové HPV (z angl. high risk HPV)
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z angl. Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

LCR	Dlouhá kontrolní oblast (z angl. long control region)
lncRNA	Dlouhá nekódující ribonukleová kyselina (z angl. long non-coding RNA)
MCM	Minichromozomový udržovací proteinový komplex (z angl. minichromosome maintenance protein complex)
M-CSF	Stimulující faktor pro makrofágy (z angl. macrophage stimulating factor)
miRNA	MikroRNA (z angl. microRNA)
MS-HRM	Metylačně-specifická analýza křivek tání s vysokým rozlišením (z angl. methylation-sensitive high resolution melting)
MS-MLPA	Metylačně specifická mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond (z angl. methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification)
ncRNA	Nekódující RNA (z angl. non-coding RNA)
p53	Jaderný protein o velikosti 53 kD
Pap test	Papanicolaouův test (z angl. Papanicolaou test)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PTM	Posttranslační modifikace (z angl. post-translational modification)
pTNM	Patologická klasifikace TNM (z angl. pathological TNM)
qPCR	Kvantitativní PCR (z angl. quantitative polymerase chain reaction)
RNAi	RNA interference
SAH	S-adenozyl-L-homocystein (z angl. S-adenosylhomocysteine)
SAM	S-adenosyl- L-methionin (z angl. S-adenosylmethionine)
SCC	Spinocelulární karcinom (z angl. squamous cell carcinoma)
SCCA	Antigen karcinomu skvamozních buněk (z angl. squamous cell carcinoma antigen)
SCF	Faktor kmenových buněk (z angl. stem cell factor)
SCJ	Skvamokolumnární junkce (z angl. squamocolumnar junction)
SIL	Skvamózní intraepiteliální léze (z angl. squamous intraepithelial lesions)
siRNA	Krátká interferující ribonukleová kyselina (z angl. short-interfering RNA)
SLIT2	Slit homolog 2 protein
TCGA	Atlas rakovinového genomu (z angl. The Cancer Genome Atlas)
TET	Tet methylcytosin dioxygenáza (z angl. tet methylcytosine dioxygenase)
TNF- $\alpha$	Faktor nádorové nekrózy $\alpha$ (z angl. tumor necrosis factor $\alpha$ )
TNM	Klasifikace zhoubných nádorů, tumor (T), uzliny (N), metastázy (M) (z angl. tumor (T), nodes (N), and metastases (M))
TZ	Transformační zóna

VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
VIA	Vizuální kontrola kyselinou octovou (z angl. visual inspection with acetic acid)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

# ÚVOD

Karcinom děložního čípku je jedním z nejčastějších typů zhoubných nádorů u žen na celém světě. V České republice téměř každý den na toto onemocnění zemře jedna žena. Hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj premaligních (přednádorových) lézí a karcinomu děložního čípku je vysoce riziková HPV infekce. Karcinomy v časném stádiu a přednádorové buněčné změny se obvykle neprojevují specifickými symptomy, a pokud nejsou maligní buňky zachyceny včas, postupně prorůstají do okolních tkání a mohou se šířit do dalších oblastí těla. Na rozdíl od většiny jiných nádorových onemocnění máme u karcinomu děložního čípku výjimečnou možnost předejít jeho vzniku. Pravděpodobnost jeho výskytu lze snížit pravidelnými gynekologickými prohlídkami a pomocí očkovacích vakcín. V případě vysoké proočkovanosti celé populace by toto zhoubné onemocnění mohlo i úplně vymizet. Infekce HPV však není jediným rizikovým faktorem.

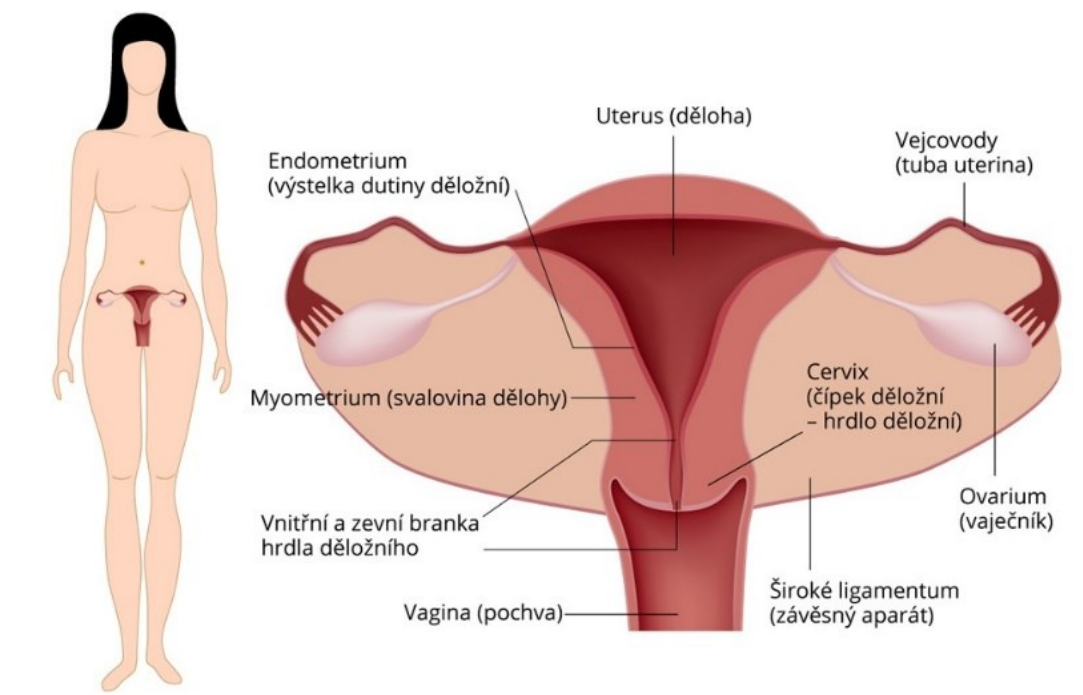
Dříve se předpokládalo, že klíčovou roli ve vývoji malignit děložního čípku hraje pouze genetická mutace. Nedávné pokroky v biologii tohoto onemocnění však odhalily, že epigenetické změny jsou běžné v karcinogenezi a metastázách děložního čípku. Na rozdíl od genetických změn, epigenetické změny jsou potenciálně reverzibilní. V tomto smyslu je důležitá jejich charakterizace, protože mají nejen potenciální využití jako biomarkery, ale také by mohly představovat nové terapeutické cíle pro léčbu malignit děložního čípku. Především metylace DNA je typem epigenetické modifikace, která je v současnosti rozsáhle studována. Reguluje expresi genů beze změny sekvence DNA a je nezbytná pro progresi karcinomu děložního čípku v patogenezi a zároveň odráží prognózu a terapeutickou citlivost v klinické praxi. Přestože chápání karcinogeneze děložního čípku se v posledních desetiletích zvyšuje, epigenetické modifikace a jejich příspěvek k rozvoji tohoto onemocnění zůstávají velkou neznámou.

V této diplomové práci jsme se proto zaměřili na nalezení potenciálně diagnostických a prognostických markerů pro karcinom děložního čípku, které jsou založeny na analýze metylace DNA a mohly by se vyšetřovat za použití neinvazivních metod.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Děložní čípek

Děložní čípek (cervix) je úzký, tubulární útvar tvořící průchod mezi dělohou a pochvou (Obr. 1). Vnitřek děložního čípku je vystlán sliznicí. Žlázy ve sliznici produkují cervikální hlen, který má imunitní funkci a chrání dělohu před průnikem nečistot a patogenů z pochvy. Z fyziologického hlediska je velmi významný při reprodukci a početí. V závislosti na fázi ženského menstruačního cyklu produkuje hlen různé konzistence, aby usnadnil nebo znemožnil vstup spermií do dělohy. V těhotenství si zachovává stále stejný tvar, který je prodloužený, tvrdý a uzavřený. S blížícím se porodem prochází rychlými změnami. Postupně se zkracuje, otvírá a měkne, což umožní průchod plodu porodním kanálem [1–3].



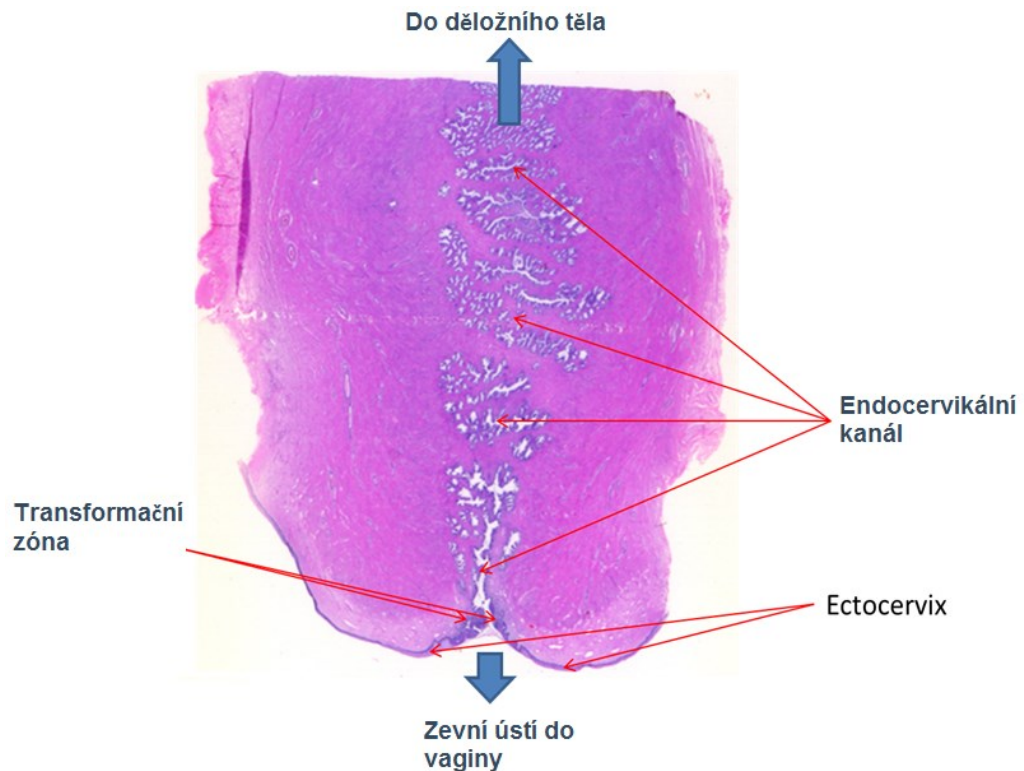
Obrázek 1: Ženské pohlavní ústrojí [4]

Děložní čípek se dělí na anatomicky definované oddíly (Obr. 2).:

- Ektocervix** je zevní část hrdla děložního vyklenutá do pochvy a je pokryta nerohovějícím vrstveným dlaždicovým epitelem.
- Endocervix** je slizniční část hrdla děložního, která je nasměrovaná dovnitř do děložní dutiny. Je pokryta jednoduchým žlázovým epitelem.
- Endocervikální kanál** je lumen, kterým cervix spojuje děložní dutinu s vaginou.



- d) **Skvamokolumnární junkce (SCJ)** je místem styku ektocervikálního a endocervikálního epitelu. Junkce obsahuje okamžitý přechod vrstveného nerohovějícího epitelu v jednoduchý cylindrický epitel.
- e) **Transformační zóna (TZ)** zahrnuje oblast metaplastických změn na cervixu mezi původní a aktuální skvamokolumnární junkcí. Více než 90 % karcinomů děložního čípku se vyvíjí převážně v transformační zóně [1,5,6].



**Obrázek 2:** Histologický řez děložním hrdlem s jednotlivými anatomickými oddíly [upraveno dle 6]

## 1.2 Karcinom děložního čípku

Maligntity děložního čípku jsou celosvětově čtvrtou nejčastější formou onkologického onemocnění vyskytující se u žen. Jedná se o zhoubné nádorové onemocnění, kdy se povrchové buňky děložního čípku začnou nekontrolovatelně množit [7].

Převážná většina případů karcinomu děložního čípku (99 %) je spojena s infekcí vysoce rizikovými lidskými papilomaviry (HPV), což je běžný virus přenášený pohlavním stykem [8].

Rozvoji karcinomu děložního čípku předcházejí prekancerózní (přednádorové) změny v děložním čípku, při kterých dochází k epiteliálním změnám buněk (Obr. 3). Prekancerózní léze se označují jako skvamózní intraepiteliální léze (SIL) nebo cervikální intraepiteliální novotvar (CIN). CIN je kategorizován do tří hlavních kategorií, a to CIN1 (mírná dysplazie), CIN2 (střední dysplazie) a CIN3 (těžká dysplazie). CIN1 a CIN2 mají větší pravděpodobnost regrese než progresu. Jejich progresu z mírné do těžké dysplazie se pohybuje okolo 1 %. CIN2 a CIN3 vyššího stupně s větší pravděpodobností progredují do invazivních karcinomů, přičemž CIN3 vykazuje míru progresu 31,1 % [9].

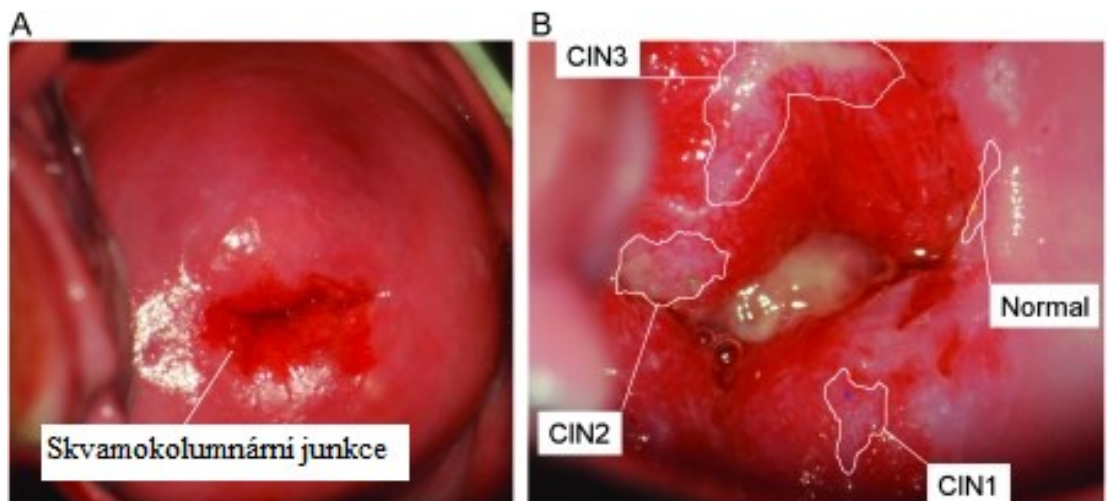
Histologická klasifikace nádorů je závazná a vychází z poslední platné TNM klasifikace (8. vydání) nádorů ženského genitálu. Na základě histologických znaků lze většinu invazivních karcinomů děložního čípku klasifikovat podle histologických abnormalit, jako spinocelulární karcinom (SCC), adenokarcinom (ADC) nebo adenoskvamózní karcinom (ASC) [10]. SCC představuje 70 % všech diagnostikovaných nádorů, zatímco AC představuje 18 % případů karcinomu děložního čípku. Ostatní histologické typy jsou raritní. SCC se vyvíjí v transformační zóně, která se nachází mezi cervikálními sloupcovými a skvamózními buňkami, a migruje do distálního endocervikálního kanálu z exocervixu s věkem podmíněnou progresí. Adenokarcinom se vyvíjí v endocervixových slizových žlázách. Karcinom děložního čípku v rámci neuroendokrinního systému je vzácný, agresivní a často chybně diagnostikovaný. Cervikální melanomy jsou důsledkem migrace metastázovaných lézí z jakékoli jiné části těla všech vnímavých žen, zatímco cervikální adenoidní cystické karcinomy jsou většinou přítomny u starších žen v časných stádiích diagnózy. Cervikální lymfom je další vzácný typ karcinomu děložního čípku, který se vyskytuje v lymfatických uzlinách v oblasti děložního hrdla [9].

Většina infekcí HPV je asymptomatická a imunitní systém je během jednoho roku odstraní. Až u 10 % žen však může infekce přetrvávat a u velmi malého počtu žen může perzistující infekce onkogenním HPV nakonec vést k rakovině děložního čípku. Nejčastější symptomy zahrnují vaginální krvácení a pánevní bolest [7,11].

Závažnosť a miesto infekcie označujú rôzne štádiá karcinomu dŕoŕžního ŕípku. Poŕateŕnŕi štádium, štádium 0 neboli cervikálnŕi karcinom *in situ*, se vyskytuje v hornŕi vrstvŕe bunŕek dŕoŕžního ŕípku. Aŕkoli se u rakoviny dŕoŕžního ŕípku štádŕa 0 mohou vyvinout malignity, pokud se nelŕeŕi, nenŕi považována za nádor. Štádium 1 je omezeno pouze na dŕoŕžnŕi hrdlo a je rozdŕeleno do dvou skupin, štádium 1A (5–7 mm) a 1B (>7 mm) s ohledem na velikost malignŕi tkánŕe. Malignita postupuje od štádŕa 1 do 2, kdy se zaŕne ŕŕŕit z dŕoŕžního ŕípku do hornŕi ŕásti pochvy.

Podobnŕe jako štádium 1 je štádium 2 rozdŕeleno do dvou kategoriŕi, a to na štádium 2A karcinomu dŕoŕžního ŕípku, kterŕe se ŕŕŕi asi do dvou tŕetin pochvy, a štádium 2B, kterŕe postupuje v pochvŕe do okolnŕich tkánŕi dŕelohy. Karcinom dŕoŕžního ŕípku štádŕa 3A se ŕŕŕi do dolnŕi pochvy a okolnŕich lymfatickŕych uzlin a následuje štádium 3B, kdy se rakovina dŕoŕžního ŕípku ŕŕŕi do pánevnŕi stŕny. V tŕeto fází nádor svou velikostŕi blokuje uretery, coŕz pŕŕsobuje zvŕtŕšení ledviny nebo dokonce zamezenŕi jejŕi funkce. Fáze 4 je nejzávaŕnŕejšŕi fází, kdy má rakovina potenciál rozŕŕŕit se do koneŕnŕiku, moŕovŕeho mŕchŕŕe, stŕevnŕiho traktu a plic [1,9].

Ŕŕinná prevence spoŕívá pŕedevšŕim v pravidelnŕch gynekologickŕch prohlŕdkách, jejichŕ souŕástŕi je screening karcinomu dŕoŕžního hrdla. Vŕasnŕ záchyt prekanceróznŕich stavŕ zvyšuje ŕspŕešnost lŕŕby [1,12].



**Obrázek 3:** A. Skvamokolumnární junkce B. Cervikální intraepiteliální neoplázie, dle rozsahu postiŕení epitelu [upraveno dle 13]

## 1.2.1 Epidemiologie

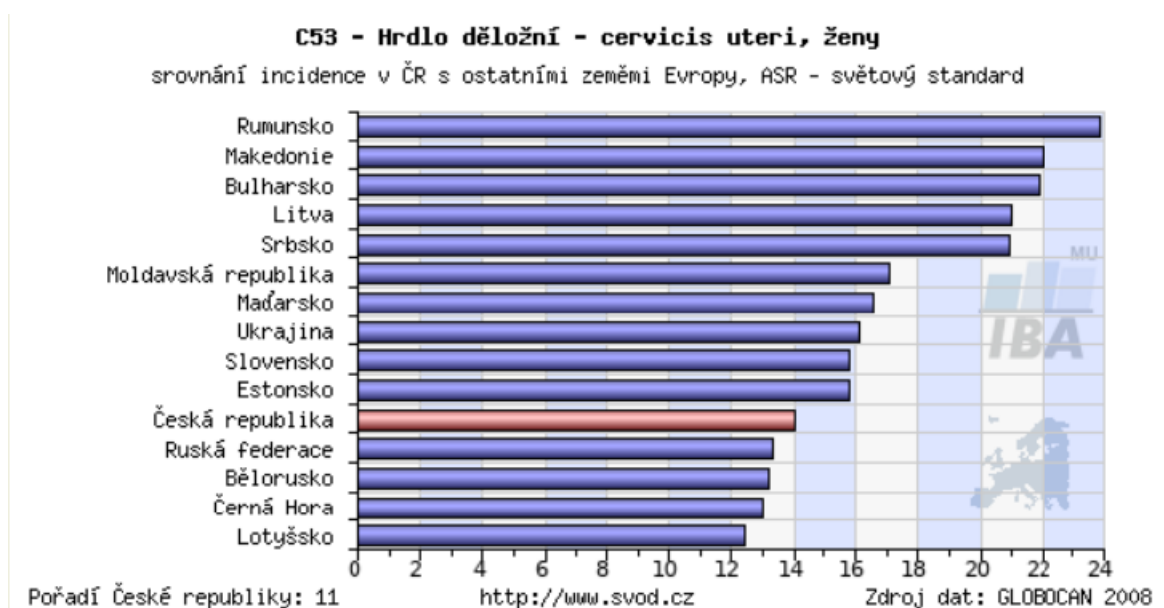
Navzdory účinným screeningovým metodám je karcinom děložního čípku nadále hlavním problémem veřejného zdraví. Předchází ji pouze rakovina prsu, jako nejčastější příčina úmrtí na rakovinu u žen na celém světě [14,15].

Na celém světě je každý rok diagnostikováno více než 500 000 nových případů karcinomu děložního čípku, 250 000 žen na tuto diagnózu ročně umírá. Většinou v důsledku pozdní diagnózy onemocnění a nedůsledné prevence [3,16].

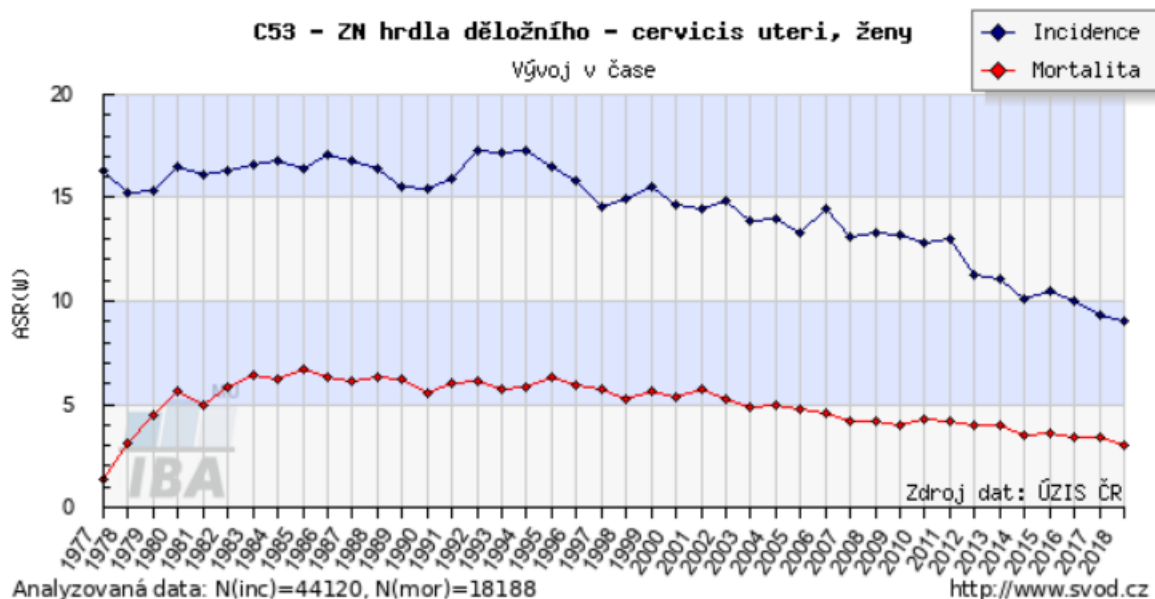
V Evropské unii pak jde o 34 000 nových případů ročně a umírá více než 16 000 žen. Jednotlivé země EU se v počtech zemřelých dosti odlišují. Nejvyšší mortalita je evidována v zemích, jako jsou Rumunsko nebo Litva (13,7/100 000 a 10/100 000). Naopak nejnižší je zaznamenávána ve Finsku (1,1/100 000) [16,17].

V mezinárodním srovnání Česká republika obsazuje nelichotivé 11. místo v rámci EU (Obr. 4) [16, 18]. Ročně je diagnostikováno přibližně 850-900 žen s tímto onemocněním. Incidence (počet nových onemocnění na 100 000 žen za jeden rok) v roce 2018 dosahovala hodnoty 9/100 000 žen (Obr. 5) [16,19].

Většina případů se vyskytuje u žen ve věku 30 a 40 let, což je věk, ve kterém ženy často zakládají rodiny a zajišťují finanční stabilitu. Kromě rizika úmrtí je karcinom děložního čípku spojen se zvýšenou morbiditou, včetně krvácení, bolesti a selhání ledvin, které jsou obtížně léčitelné, zejména v komunitách se špatným přístupem ke zdravotní péči [14].



**Obrázek 4:** Srovnání incidence karcinomu děložního čípku v ČR s ostatními zeměmi Evropy [20]

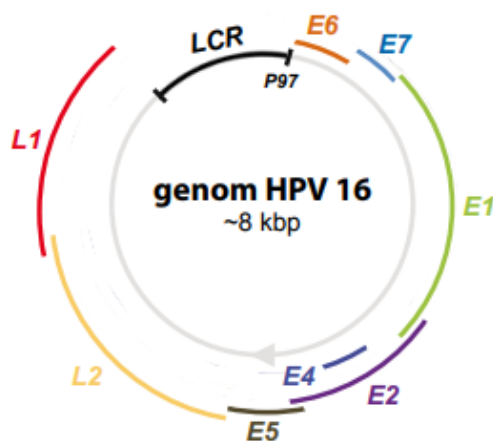


**Obrázek 5:** Incidence a mortalita karcinomu děložního čípku v České republice: přepočty na 100 000 žen [20]

### 1.2.2 Etiopatogeneze – HPV infekce

Hlavním etiopatogenetickým činitelem karcinomu děložního čípku je infekce způsobená onkogenním typem lidského papilomaviru (HPV – human papilloma virus) [10]. HPV je DNA virus s kruhovým genomem o velikosti přibližně 8000 bp (Obr. 6), který obsahuje časnou oblast kódující rané virové proteiny E6, E7, E8, E1, E2, E4 a E5 a oblast kódující proteiny L1 a L2, které jsou součástí virové kapsidy. Dlouhá kontrolní oblast (LCR) je nekódující oblast zapojená do virové replikace a transkripce. Exprese virových proteinů je spojena s programem buněčné diference, a proto jsou tyto proteiny odlišně exprimovány ve vrstvách cervikálního epitelu. Proteiny, které jsou nejprve exprimovány, jsou E1 a E2, které regulují virovou replikaci a transkripci. Pro stabilní vazbu E1 helikázy na místo LCR je nutná tvorba komplexu E1-E2. E2 je transkripční regulátor časně exprimovaných HPV genů; když se E2 váže na čtyři E2-vazebné domény v LCR, řídí transkripční hladiny E6 a E7 virových onkogenů. Krok transformace není běžným výskytem infekce HPV a pouze malý počet cervikálních lézí infikovaných vysoce rizikovými typy HPV se vyvine v karcinom děložního čípku. Někdy se z dosud neznámých důvodů genom HPV náhodně integruje do hostitelské DNA. Během tohoto procesu se HPV DNA často zlomí v jakékoli poloze v oblasti E1-E2. Při ztrátě E2 se E6 a E7 aktivně exprimují, což podporuje cervikální transformaci.

Podle onkogenního potenciálu jsou HPV členěny na vysoce rizikové (HR-HPV) nebo nízko rizikové (LR-HPV), přičemž první typ je spojen s anogenitální rakovinou a druhý typ s genitálními bradavicemi nebo epitelálními lézemi [21].



**Obrázek 6:** Schématické zobrazení polohy jednotlivých genů v rámci kruhového genomu HPV 16

E1 – protein počátku virové replikace, E2 – protein regulátoru transkripce, viru, E4 - protein uvolnění infekčních virionů do okolí, E5 - onkogen růstového faktoru, ochrana proti cytotoxickým T lymfocytům, E6 - inaktivuje ochránce buněčné integrity, buněčný protein p53 a aktivuje telomerázu, E7 - immortalizuje buňku, L1 - hlavní strukturální protein výstavby virového obalu, L2 - protein zabalení virové DNA do virionu [22]

**Vysoce rizikové HPV** vyvolávají především přechodné infekce, avšak s větší pravděpodobností persistence. Za společného působení s dalšími rizikovými faktory se mohou integrovat do hostitelské DNA, a pokud nedojde k včasnému ošetření, mohou se vyvinout v karcinom [23]. Mezi vysoce rizikové typy patří HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68 a 59. Nejvyšší riziko maligní transformace buněk děložního čípku představují především HPV typy 16 a 18, které způsobují asi 70 % všech invazivních karcinomů děložního čípku na světě [14].

**Nízce rizikové HPV** jsou sdruženy s kondylomy (genitálními bradavicemi) a jde nejčastěji pouze o přechodnou infekci. Imunitní systém se většinou s touto infekcí dokáže vyrovnat apoptózou infikovaných buněk a následnou regenerací dlaždicového epitelu [24].

Prekancerózní změny nebo velmi časná stádium onemocnění jsou obvykle asymptomatické a jsou detekovány na stěru z děložního čípku. Symptomy se obvykle objevují, když nádor způsobuje spontánní nebo kontaktní krvácení či bolest, pokud jsou postiženy lymfatické uzliny. Mezi další příznaky patří páchnoucí vaginální výtok nebo bolesti zad [25].

Rizikové faktory pro HPV a karcinom děložního čípku zahrnují věk při prvním styku, více sexuálních partnerů, kouření, herpes simplex, HIV, koinfekci s jinými genitálními infekcemi a užívání perorální antikoncepce. HPV se přenáší kontaktem kůže na kůži, včetně pohlavního styku, kontaktu ruky s pohlavním orgánem a orálního sexu [3].

Imunitní odpověď hraje důležitou roli při odstraňování HPV infekcí. Většina HPV infekcí je díky přirozeným imunitním mechanismům během 1 až 2 let potlačena. Bohužel některé infekce nelze eliminovat a přetrvávají několik let a stávají se dalším rizikovým faktorem. Přibližně v 10 % dochází k perzistenci infekce, která se nakonec může vyvinout v premaligní léze děložního čípku a invazivní karcinom děložního čípku [10,14,25].

### 1.2.3 Screening a diagnostika

Základním předpokladem pro úspěšnou léčbu nádorového onemocnění děložního čípku je včasná diagnóza. Rané stádium karcinomu děložního čípku nezpůsobuje žádné klinické příznaky, prekancerózní stádia jsou však zjištělná screeningem [26]. Termínem „onkologický screening“ definujeme celkové výkony prováděné k detekci časného nástupu nádorů [27]. V současné době existují dva typy testů pro screening karcinomu děložního čípku Pap test (Papanicolaouův test) a HPV test [28]. Pokud je výsledek těchto testů abnormální přistupuje se k provedení dalších diagnostických testů [26].

**Pap test** je obvykle prvním krokem k určení zdraví děložního čípku a často se provádí jako součást rutinního screeningu. Jeho pravidelné provedení snižuje výskyt karcinomu děložního čípku a mortalitu nejméně o 80 %. Provádí se použitím štětečku nebo špachtle k jemnému seškrábnutí buněčného materiálu ze skvamokolumnárního spojení děložního čípku. Vzorek se nanese na podložní sklíčko o rozměrech cca 25 mm × 50 mm. Buňky jsou fixovány v methanolu, obarveny a vizuálně zkoumány pod mikroskopem [26,29].

Ženy s abnormální cytologií by měly být dále testovány kolposkopií a biopsií. Kolposkop je binokulární mikroskop, který umožňuje vizuální kontrolu děložního čípku. Abnormality nalezené kolposkopií mohou být odebrány biopsií pro další klasifikaci. Biopsie zahrnuje vyříznutí vzorku tkáně z děložního čípku, který je následně patologem zkoumán pod mikroskopem [30].

V případě pozitivního nálezu Pap testu, lze provést i laboratorní **HPV test**. Používá se k vyšetření přítomnosti DNA nebo RNA vysoce rizikových typů HPV v cervikálním stěru. Tento test lze provést současně ze vzorku buněk odebraných během Pap testu [26]. Základní nevýhodou metod detekce HPV DNA v klinické praxi je jejich nízká

specificita. Infekce HPV jsou totiž obvykle přechodné a většina z nich nezpůsobuje žádné vážné následky. Pouze malá část infekcí HPV iniciuje onkogenní proces, který nakonec vede k rozvoji prekanceróz a vzniku malignit [31].

Důležité je si uvědomit, že některé karcinomy děložního čípku nemají prekancerózní stádium, a proto je nelze detekovat screeningem děložního hrdla. Obvykle se jedná o vzácné, ale agresivní rakoviny, jako je neuroendokrinní karcinom [11].

#### 1.2.4 TMN klasifikace a FIGO klasifikace

Stanovení klinického stádia nádoru tzv. staging je důležité pro poskytnutí co nejpřesnějšího odhadu prognózy a volbu optimální léčby. Stagingové systémy umožňují srovnání výsledků léčby napříč zeměmi a kontinenty. Obecně se klinický staging rakoviny určuje na základě fyzikálního vyšetření, zobrazovacích metod a biopsií postižené oblasti. To umožňuje kompletní posouzení lokalizace primárního nádoru, včetně jeho velikosti a rozsahu, postižení lymfatických uzlin a hodnocení vzdáleně metastatického onemocnění [32,33]. Staging rakoviny děložního čípku může být klasifikován podle systému TNM nebo FIGO. V České republice se používá kombinace obou těchto klasifikačních systémů.

**TNM systém** pro klasifikaci zhoubných nádorů byl vyvinut ve Francii ve 40. letech Pierrem Denoixem a stal se uznávaným základem pro stanovení stagingu rakoviny. Kategorie (T) popisuje rozsah primárního nádoru. Posuzuje velikost, hloubku invaze nebo invazi přilehlých struktur. Kategorie (N) označuje nepřítomnost nebo rozsah metastáz v lymfatických uzlinách a kategorie (M) vyjadřuje nepřítomnost, resp. přítomnost vzdálených metastáz. Z hodnot T, N a M je následně určeno tzv. klinické stádium onemocnění. Klinické stádium (cTNM) je stanoveno před zahájením terapie a je určeno na základě klinického vyšetření. Zahrnuje fyzikální vyšetření lékařem, laboratorními nálezy a zobrazovací vyšetření. Po chirurgickém a histologickém vyšetření tkáně se hodnotí patologická klasifikace TNM (pTNM). cTNM řídí přístup k vyšetřování a léčbě, zatímco pTNM řídí použití adjuvantních terapií. Obě klasifikace udávají prognózu nemoci [34,35,36].

Onemocnění se rozděluje do 4 stádií (I až IV), rozdělení je specifické pro každý typ nádoru. V některých případech jsou pro určení stádia vedle hodnot T, N a M hodnoceny i rizikové faktory. Stádium 4 zpravidla znamená přítomnost vzdálených metastáz. Shrnutí stádií je uvedeno v tabulce (Tab. 1) [37].

Druhým systémem používaným k hodnocení stádia karcinomu děložního čípku je **systém FIGO**, vyvinutý Mezinárodní federací porodnictví a gynekologie (Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique). Tento systém je založený na posuzování



velikosti nádoru a rozsahu šíření nemoci do pánevní oblasti a vzdálených orgánů. Posuzuje klinické stádium, které závisí na výsledcích fyzikálního vyšetření, biopsii, zobrazovacích metodách a několika dalších testech (např. cystoskopie a proktoskopie). Dále se určuje patologické stádium, které vychází z nálezů při operaci, ale nemění klinické stádium pacienta. Léčebný plán je založen na klinickém stádiu [38,39].

Stagingový systém FIGO popisuje čtyři progresivně pokročilejší stádia karcinomu děložního čípku, od stádia I do stádia IV. Shrnutí fází a dílčích fází FIGO je uvedeno v tabulce (Tab. 1) [38].

**Tabulka 1:** Karcinom děložního čípku - klasifikace TNM (8. vydání, 2017) a FIGO (revize 2018) [40]

TNM kategorie	FIGO stadium	Rozsah onemocnění
<b>T1</b>	I	nádor omezen na dělohu
T1a	IA	preklinický nádor – patrný pouze mikroskopicky
T1a1	IA1	vertikální rozměr $\leq 3$ mm, horizontální $\leq 7$ mm
T1a2	IA2	vertikální rozměr $\leq 5$ mm, horizontální $\leq 7$ mm
T1b	IB	klinicky patrný nádor
T1b1	IB1	největší rozměr nádoru $\leq 4$ cm
T1b2	IB2	největší rozměr nádoru $> 4$ cm
<b>T2</b>	II	šíření do prox. 2/3 pochvy nebo do části parametrií
T2a	IIA	šíření do proximálních 2/3 pochvy
T2a1	IIA1	největší rozměr nádoru $\leq 4$ cm
T2a2	IIA2	největší rozměr nádoru $> 4$ cm
T2b	IIB	šíření do části parametrií
<b>T3</b>	III	šíření do parametrií až k pánevní stěně, nebo do dolní 1/3 pochvy
T3a	IIIA	šíření do dolní třetiny pochvy
T3b	IIIB	šíření k pánevní stěně nebo přítomnost hydronefrózy
<b>T4</b>	IVA (při MO)	infiltrace sliznice močového měchýře, nebo rekta
N1	IIIB (jakékoliv T)	postižení regionálních lymfatických uzlin
M1	IVB (jakékoliv T N)	vzdálené metastázy

### 1.2.5 Léčba

Léčba karcinomu děložního čípku závisí především na velikosti nádoru, a zda se malignita rozšířila do okolních tkání. Možnosti léčby zahrnují chirurgii, radioterapii a chemoterapii, které lze vzájemně kombinovat. Prekancerózní léze vyskytující se u žen mladších 25 let jsou léčeny konzervativně [2,3,38].

V případě, že je nádor objeven v raném stádiu, může stačit malý chirurgický zákrok tzv. konizace. Zahrnuje excizi kuželovité části děložního čípku k odstranění cervikální léze spolu s celou transformační zónou. Tento způsob léčby umožňuje mladším ženám zachování funkce vaječníků a plodnost. U případů, kde se nádor již rozšířil do okolní tkáně, lékaři

obvykle doporučují radikální hysterektomii (odstranění dělohy). Odstraněny jsou i regionální lymfatické uzliny. V úvahu přichází i radioterapie [9].

Cílem radioterapie je zničit rakovinné buňky pomocí různých forem záření, včetně vysokoenergetického rentgenového záření. Paprsky pronikají do těla a ničí rakovinné buňky. Rakovina je zcela odstraněna nebo částečně eliminována. Zničené rakovinné buňky jsou z těla vyloučeny. Radioterapie se podává v pokročilých fázích karcinomu děložního čípku [9,38]. U velmi pokročilých nádorů, které se již šíří do okolí dělohy, se přistupuje ke kombinaci radioterapie (ozařování) a chemoterapie, která účinek ozařování zvyšuje [2,3,41].

Chemoterapie inhibuje růst buněk rakoviny děložního čípku tím, že brání jejich aktivnímu dělení a růstu pomocí chemoterapeutických sloučenin, jako jsou karboplatina, cisplatina, methotrexát, paclitaxel a topotekan. Zřídka se používá samostatně, jako primární léčba rakoviny děložního čípku; spíše se používá v kombinaci s radioterapií a méně často s chirurgickým zákrokem [9,38].

### **1.2.6 Prevence**

Preventivní opatření ke snížení výskytu karcinomu děložního čípku lze členit na primární a sekundární. Primární prevence se zaměřuje na snížení infekce podáním vakcíny proti HPV. Sekundární prevence zahrnuje screening karcinomu děložního čípku a léčbu prekancerózních lézí [42].

V současné době existují 4 vakcíny, které byly kvalifikovány WHO (World Health Organization). Všechny chrání proti HPV typu 16 a 18 způsobující převážnou většinu diagnostikovaných případů karcinomu děložního čípku. 9valentní očkovací látka chrání před 5 dalšími onkogenními typy HPV způsobujícími dalších 20 % karcinomu děložního čípku. Dvě z vakcín také chrání proti HPV typu 6 a 11 přítomných u anogenitálních bradavic. Vakcíny nejsou účinné při léčbě již existující HPV infekce. Cílovou skupinou pro očkování doporučenou WHO jsou dívky ve věku 9 až 14 let, které se zatím nestaly sexuálně aktivními. Tyto dívky vykazují lepší imunitní odpověď na vakcínu [42,43]. V České republice je doporučováno očkovat i chlapce. Očkování má stejné schéma jako u dívek a probíhá mezi 13. a 14. rokem. Očkovat se mohou i starší lidé, vakcinace by však měla být nejlépe dokončena před zahájením pohlavního života.

Primární prevence karcinomu děložního čípku se do značné míry překrývá s primární prevencí pohlavně přenosných chorob, včetně HIV. Vzhledem k tomu, že pohlavně přenosné choroby jsou obecně spojeny s počtem sexuálních partnerů a nechráněným pohlavním

stykem, preventivní opatření se nejprve zaměřuje na snížení počtu sexuálních partnerů a na poskytování „bariérových metod“, jako jsou kondomy [42].

Sekundární prevencí je screening karcinomu děložního čípku. Testování se provádí u žen, které nemají žádné příznaky a mohou se cítit naprosto zdravé. Může tedy dojít k odhalení malignity v brzkém stádiu a zajistit tak velmi vysokou šanci na úplné uzdravení. Diagnostické metody screeningu zahrnují cytologický stěr (Pap test), testování HPV DNA na vysoce rizikové kmeny viru HPV a vizuální kontrolu děložního čípku kyselinou octovou (VIA) [8].

### 1.3 Epigenetika

Epigenetika je definována jako dědičné změny v genové expresi, které na rozdíl od mutací nelze připsat změnám v sekvenci DNA. Tyto změny mohou být vyvolány faktory životního prostředí nebo případně ovlivněny stravou. Mezi nejběžnější epigenetické mechanismy se řadí DNA metylace, modifikace jaderných histonů a posttranskripční regulace zprostředkovaná malými molekulami RNA [44,45].

V posledních několika desetiletích výzkumy ukázaly, že epigenetické mechanismy se podílejí na regulaci všech biologických procesů v těle od početí až po smrt. Uplatňují se na celé řadě úrovní a hrají významnou roli např. v morfogenezi, při diferenciaci buněk nebo při proliferaci. Narušení epigenetických procesů může vést ke změně funkce genu a maligní buněčné transformaci [46–48].

Epigenetika je jedním z vysvětlení, jak mohou mít buňky a organismy s identickou DNA tak dramatické fenotypové rozdíly [45].

#### 1.3.1 Methylace DNA

Methylace DNA je jednou z nejintenzivněji studovaných epigenetických modifikací u savců. V normálních buňkách zajišťuje správnou regulaci genové exprese a stabilní umlčování genů. Je spojena s modifikacemi histonů a souhra těchto epigenetických modifikací je zásadní pro regulaci fungování genomu změnou struktury chromatinu. U člověka dochází k metylaci DNA hlavně v místech CpG. Až 80 % všech míst CpG v lidské DNA je metylovaných [49,50].

Methylace DNA zahrnuje kovalentní přenos metylové skupiny ( $\text{CH}_3$ ) do pozice 5 na cytosinovém kruhu v dinukleotidu CpG (Cytosin-fosfát-Guanin) za vzniku 5-metylcytosinu (5-mC) (Obr. 7) [51]. CpG dinukleotidy jsou v lidském genomu metylovány a jejich methylace ovlivňuje buněčnou diferenciaci a vývoj tkání. Akumulované CpG dinukleotidy tvoří tzv. CpG ostrůvky, které se často vyskytují v oblasti promotoru a exonu 1 (regulační oblasti genů).

Jsou převážně nemetylovaná, ale mohou být i metylovány v případě, kdy je potlačena exprese genu [52]. Podílejí se na regulaci chromatinové struktury, čímž ovlivňují vazbu transkripčních faktorů a výsledně i genovou expresi [53].

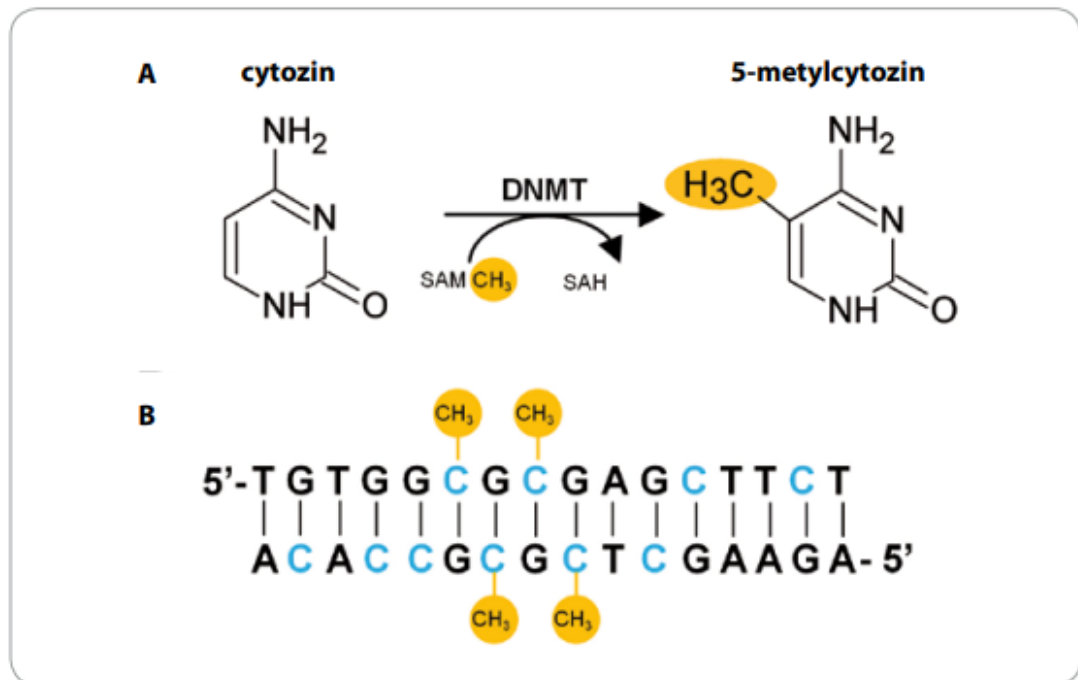
Tato enzymatická reakce je katalyzována třemi DNA metyltransferázami (DNMT), které využívají jako zdroj metylové skupiny z kofaktoru S-adenosyl-L-methionin (SAM). Hladiny SAM jsou ovlivněny příjmem vitamínů, jako je kyselina listová, vitamín B12 a vitamín B6, ze stravy [52,54,55].

Existují čtyři členové rodiny DNMT, konkrétně se jedná o DNMT1, DNMT3A, DNMT3B a DNMT3L. DNMT3L, na rozdíl od ostatních DNMT, nevykazuje žádnou vlastní enzymatickou aktivitu. Ostatní tři zmiňované DNMT jsou aktivní na DNA. DNA metyltransferáza-1 (DNMT1) je převládajícím enzymem zodpovědným za udržování metylace během buněčného cyklu po replikaci DNA. Katalyzuje připojení metylové skupiny k dinukleotidu CpG na hemimetylovaných vláknech DNA během replikace. DNMT3A/DNMT3B kóduje *de novo* metyltransferázy, nutné k vytvoření a udržení genomové metylace. DNMT hrají důležitou roli v genomové integritě, jejíž narušení může vést k nestabilitě chromozomů a progresi nádoru. Je dobře známo, že DNMT jsou nezbytné pro transkripční umlčení řady tříd sekvencí, včetně imprintovaných genů, genů na neaktivním X chromozomu. Umlčování těchto sekvencí je nezbytné pro udržení stability chromozomů [53,56,57].

Metylace DNA je typicky odstraněna během tvorby zygoty a poté je znovu obnovena v embryu přibližně v době implantace. Většina metylace DNA je nezbytná pro normální vývoj jedince a hraje velmi důležitou roli v řadě klíčových procesů včetně genomového imprintingu či inaktivace X-chromozomu, a když je dysregulována, přispívá k chorobám, jako jsou nádorová onemocnění [51].

Demetylace DNA je proces odstranění metylové skupiny z cytosinů. Proces řídí translokační protein TET (tet methylcytosine dioxygenase), který katalyzuje konverzi 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin a následně na cytosin. Demetylace DNA může být pasivní nebo aktivní. Pasivní proces probíhá v nepřítomnosti metylace nově syntetizovaných řetězců DNA pomocí DNMT1 během několika replikačních kol – například po ošetření 5-azacytidinem. Tato farmaceutická demetylační činidla působí prostřednictvím inhibice DNMT1 a podporují jeho degradaci proteosomy. Tento přístup se v současnosti používá u malignit k demetylaci tumor supresorových genů. K aktivní demetylaci DNA dochází přímým odstraněním metylové skupiny nezávisle na replikaci DNA. Metylace DNA

obvykle vede k umlčení genu, zatímco demethylace DNA je spojena s aktivací genové exprese [58,59].



**Obrázek 7:** A. DNA metyltransferáza katalyzuje přeměnu cytosinu na 5-metylcytosin. Zdroj metylovaných skupin je S-adenozyl-methionin (SAM), který je konvertován na S-adenozyl-homocystein (SAH). B. Metylace cytosinu nastává pouze u CpG dinukleotidů [47].

### 1.3.1.1 Metylce DNA v karcinogenezi

Metylce DNA je důležitým regulátorem genové transkripce a její role v karcinogenezi je v posledních letech předmětem značného zájmu. Změny v metylaci DNA jsou běžné u různých typů nádorů. Ze všech epigenetických modifikací byla nejrozsáhleji studována hypermetylce, která potlačuje nasednutí transkripčních faktorů na promotorové oblasti tumor supresorových genů vedoucí k umlčení genu. Globální hypometylce však byla také uznána jako příčina onkogeneze. U nádorových buněk se také často vyskytuje komplexní ztráta metylce soustředěná do hypometylovaných bloků [53,60].

### 1.3.1.2 Hypometylce

Hypometylce DNA představuje ztrátu metylové skupiny v 5-metylcytosinovém nukleotidu. Hypometylce vysoce opakovaných sekvencí DNA, které zahrnují přibližně polovinu genomu, je z velké části zodpovědná za globální hypometylaci DNA, která je tak často pozorována u malignit. Globální hypometylce DNA se vyskytuje v různých genomových sekvencích včetně repetitivních prvků, retrotranspozónů, promotorů chudých na

CpG a intronů. Tyto oblasti jsou ve zdravém genomu normálně metylovány. Hypometylace DNA na repetitivních sekvencích vede ke zvýšené genomové nestabilitě [48,50,61].

Hypometylace regulačních oblastí transkripce u rakoviny se zdá být mnohem méně častá než hypermetylace CpG ostrovů překrývajících se promotorů. Nicméně některé ztráty metylace DNA spojené s rakovinou zahrnují genové oblasti, včetně sekvencí pro kontrolu transkripce [61,62].

#### **1.3.1.3 Hypermetylace**

K hypermetylací DNA dochází, když je více metylových skupin přeneseno na jeden cytosin, který by neměl být metylován, což vede k umlčení genu. Genomická hypermetylace u malignit byla pozorována nejčastěji na CpG ostrovech v genových oblastech [59,63].

Hypermetylace promotorových oblastí v tumor supresorových genech může inaktivovat mnoho tumor supresorových funkcí. Studie o hypermetylací DNA poskytly nové poznatky o tumorigenezi. DNMT jsou důležité při metylaci DNA i hypermetylací. Aktivita DNMT3B (DNA Methyltransferase 3 Beta) je jedním z hlavních faktorů hypermetylace DNA [59].

Úrovně metylace také hrají důležitou roli při dělení buněk, opravě DNA, diferenciaci, apoptóze, angiogenezi, metastázování, reakci růstového faktoru, detoxikaci a rezistenci vůči lékům. Tyto vlastnosti podpořily obrovský pokrok v časné detekci karcinomu pomocí analýzy úrovně metylace [46].

#### **1.3.1.4 Genomický imprinting**

Genomický imprinting je epigenetický proces, při kterém dochází k expresi malé skupiny genů, nazývaných imprintované geny, v závislosti na jejich rodičovském původu. Zatímco neimprintované geny exprimují obě kopie obsažené na homologních chromozomech, v imprintovaných genech je exprimována buď mateřská, nebo otcovská kopie, čímž se obcházejí zákony mendelovské dědičnosti. Z důvodu genomového imprintingu nejsou rodičovské genomy funkčně ekvivalentní, z čehož vyplývá, že oba genomy jsou nutné pro správný vývoj jedince. Expresie imprintovaného genu je koordinovaně řízena prostřednictvím metylace DNA. Potlačená alela je metylována, zatímco aktivní alela je nemetylována. Deregulace imprintingu je příčinou četných lidských patologií. Mezi nejznámější stavy patří Prader-Willi syndrom a Angelmanův syndrom [64-66].

### 1.3.1.5 Metody stanovení metylace DNA

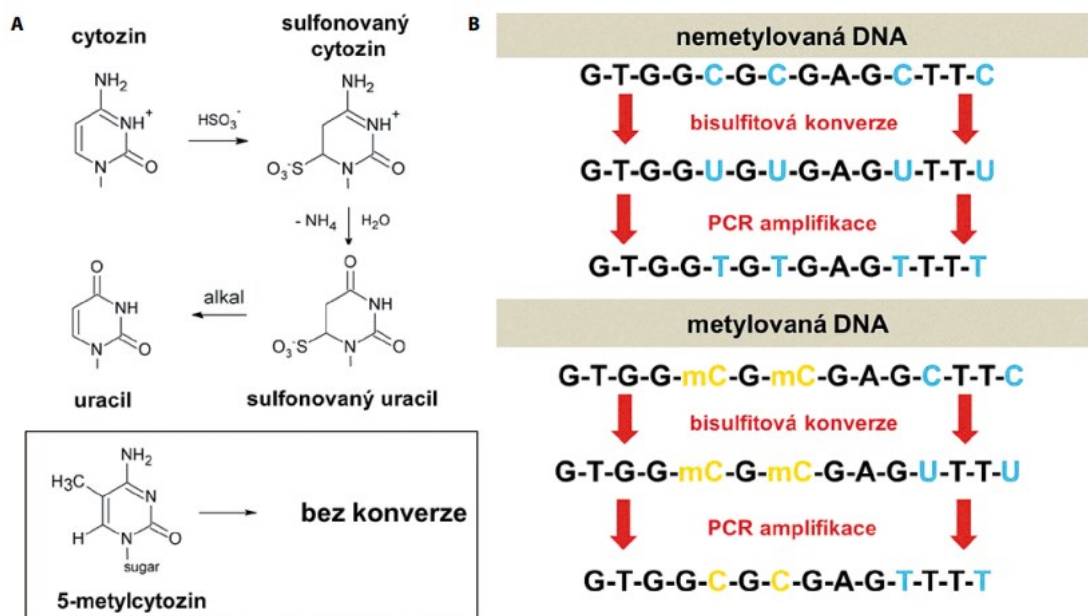
Mezi postupy, které jsou schopné kvantifikovat globální metylaci DNA, řadíme např. HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), ELISA (enzymová imunosorbentní analýza) nebo i LC-MS/MS (kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií). Metody, které jsou schopny určit míru metylace konkrétního místa v DNA, tj. obvykle sekvence genu nebo jeho promotoru, jsou založené na schopnosti odlišit cytosin od 5-metylcytosinu v sekvenci DNA. Obvykle se používá několik metod zároveň a vybrané přístupy se odvíjejí od požadovaného výsledku, tedy zda je potřeba získat informace o metylaci v konkrétních lokusech, nebo získat představu o rozsahu metylace v celém genomu [67,68].

**Restrikční analýza** je jednou z používaných metod. Využívá tzv. restrikční endonukleázy, což jsou enzymy, které rozpoznávají a štěpí DNA ve specifické sekvenci. Existují restrikční endonukleázy, které rozpoznávají stejnou sekvenci DNA, ale jedna z nich je citlivá na metylaci cytosinu, což znamená, že nedokáže štěpit DNA, pokud je metylována, zatímco druhá štěpí DNA bez ohledu na to, zda je sekvence DNA metylována nebo ne. Jeden takový pár enzymů je HpaII a MspI; oba rozpoznávají sekvenci CCGG, ale HpaII nebude štěpit, pokud je druhý cytosinový zbytek v sekvenci metylován. Takové enzymové páry se efektivně používají k získání celkových rozdílů v metylaci mezi dvěma vzorky DNA. Restrikční analýza se používá ve spojení s kvantitativní PCR (qPCR). DNA je nejdříve štěpena vhodnou endonukleázou a následně pouze nefragmentovaná DNA (tudíž pouze metylovaná DNA anebo nemetylovaná DNA, v závislosti na použité restriktaze) je amplifikována a současně kvantifikována pomocí qPCR. Tato metoda může být limitována svou aplikací, která je možná pouze u sekvencí obsahujících jejich specifické rozpoznávací sekvence [47,69,70].

**MS-MLPA** (Multiplex ligation-dependent probe amplification) je semikvantitativní metoda pro rychlé vyhodnocení hypermetylace promotorů nebo úrovně metylace imprintovaných oblastí v genomové DNA. Technika spočívá v použití endonukleázy *HhaI*, která je citlivá na metylovanou DNA. Výhodou této techniky je, že DNA nevyžaduje předchozí ošetření bisulfitem, proto metoda zachovává celistvost DNA a metylačních značek. Genomová DNA (gDNA) je nejprve denaturována, poté následuje přidání sond MS-MLPA a 16hodinový hybridizační krok. Následně je tento komplex sonda-DNA současně ligován a štěpen metylačně specifickými enzymy. Pokud je místo CpG metylováno, bude detekován normální produkt MLPA. Pokud není CpG místo metylováno, komplex DNA-sonda bude štěpen enzymem citlivým na metylaci a nevytvoří se žádný

amplifikační produkt. Sondy MLPA cílí na sekvence o délce 50–100 nukleotidů, což znamená, že mohou detekovat metylaci ve vysoce fragmentovaných vzorcích DNA, jako je bisulfitově konvertovaná DNA nebo DNA extrahovaná ze vzorků tkáně FFPE (fixované formalínem) [71–73].

**Bisulfitová konverze** se považuje za nejvhodnější a nejúčinnější způsob pro navazující analýzu metylace DNA. Metoda využívá chemické reakce s použitím hydrogensířičitanu sodného (sodium bisulfite), který může selektivně deaminovat cytosin, ale nikoli 5-metylcytosin na uracil. To vede k primární změně sekvence v DNA, která umožní odlišit cytosin od 5-metylcytosinu. Takto bisulfitem ošetřený vzorek DNA je pak PCR amplifikován, přičemž uracil je amplifikován jako tymin a metylcytosin jako cytosin (Obr. 8). Tím jsou získány dvě různé sekvence DNA v závislosti na původní metylaci [47,74].



**Obrázek 8:** A. Bisulfitová přeměna B. Primární sekvence po bisulfitové konverzi  
A. Bisulfitová přeměna zahrnuje sérii kroků včetně sulfonace, deaminace, a nakonec při zvýšeném pH je provedena desulfonace. Výsledkem je změna nemetylovaného cytosinu na uracil, zatímco 5-metylcytosin zůstává nezměněn. B. Stejná primární sekvence DNA se po bisulfitové konverzi a PCR amplifikaci liší podle toho, zda byla původně metylována nebo nemetylována. Metylcytosin se amplifikuje jako cytosin, zatímco uracil jako tymin [47].



**MS-HRM** (metylačně-specifická analýza křivek tání s vysokým rozlišením) je metoda založená na PCR ve zkumavce pro detekci úrovní metylace v konkrétních požadovaných lokusech. Princip detekce metylace DNA je založen na návrhu specifických primerů a měření rozdílů v charakteristikách tání mezi metylovanými a nemetylovanými alelami po bisulfitové konverzi. Po bisulfitové konverzi je DNA podrobena PCR, ve které je přítomno saturační fluorescenční barvivo. Když se barvivo naváže na dvouvláknovou DNA, nezpůsobuje fluorescenci, což umožní sledovat proces amplifikace během PCR. Po určitém počtu cyklů se teplota zvýší, aby se amplikony disociovaly. Jak se teplota postupně zvyšuje, dvoušroubovice disociuje a uvolňuje navázané barvivo, čímž dochází k poklesu fluorescence. Amplikon z templátu s vysokou úrovní metylace, obsahující vysoký podíl cytosinu (C) a guaninu (G) po bisulfitové konverzi, bude tát při vyšší teplotě než templáty z nemetylované DNA s vysokým obsahem adeninu (A) a thyminu (T) [75].

### 1.3.2 Modifikace histonů

Druhým epigenetickým mechanismem jsou posttranslační modifikace histonových proteinů. Tyto modifikace zahrnují enzymem katalyzovanou acetylaci, metylaci a fosforylaci, z nichž každá mění interakce DNA-histon v nukleozomech. Histonové modifikace hrají nejen důležitou roli v regulaci struktury chromatinu a jaderných procesů, ale mohou být také předány dceřiným buňkám jako epigenetické značky [76,77].

DNA v buňkách je zabalena jako chromatin, dynamická struktura složená z nukleozomů jako základních stavebních bloků. Histony jsou centrální složkou nukleozomální podjednotky, tvořící oktamer obsahující čtyři jádrové histonové proteiny (H3, H4, H2A, H2B), kolem kterých je obtočený segment DNA o 147 párech bází. Každý z převážně globulárních histonových proteinů má charakteristický postranní řetězec nebo konec, který je hustě osídlen bazickými lysinovými a argininovými zbytky. Histonové konce podléhají rozsáhlým kovalentním posttranslačním modifikacím (PTM), které spolupracují na řízení stavu chromatinu např. včetně acetylace, metylace a fosforylace. Tyto PTM jsou ukládány a odstraňovány specializovanými enzymy modifikujícími histony. Díky této vlastnosti jsou epigenetické modifikace reverzibilní, a tedy schopné dynamicky modulovat strukturu chromatinu za účelem aktivace nebo umlčení genové exprese. Některé PTM mohou změnit hustotu náboje mezi histony a DNA, což má dopad na organizaci chromatinu a základní transkripční procesy, ale mohou také sloužit jako rozpoznávací moduly pro specifické vazebné proteiny [78,79].

Obecně jsou modifikace histonů katalyzovány specifickými enzymy, které působí převážně, ale ne výlučně (např. některé typy fosforylace histonů), na N-koncových úsecích histonů zahrnujících aminokyseliny, jako je lysin nebo arginin, stejně jako serin, threonin, tyrosin atd. [80].

Změněné globální úrovně acetylace histonů, zejména acetylace H4 na lysinu (K)16, byly spojeny s rakovinovým fenotypem u různých druhů malignit a mají potenciální prognostickou hodnotu. Když dojde k hyperacetylaci, konkrétně zahrnující protoonkogeny, může být aktivována genová exprese, zatímco hypoacetylace nádorových supresorů se často lokalizuje na promotorech. Tento jev se vyskytuje současně s metylací DNA, což vede k umlčování genů. Podobně jako u metylace DNA, posttranslační modifikace histonů neovlivňují nukleotidovou sekvenci DNA, ale mohou modifikovat její dostupnost pro transkripční aparát [78,80].

### **1.3.3 RNA interference (RNAi)**

Nejnověji objasněným epigenetickým mechanismem je umlčení genu spojeného s nekódující RNA. Nekódující RNA (ncRNA) je funkční molekula RNA, která je transkribována, ale není překládána do proteinů. Pozoruhodné molekuly ncRNA zahrnují mikroRNA (miRNA) a krátké interferující RNA (siRNA), které obsahují méně než 30 nukleotidů, a dlouhé nekódující RNA (lncRNA), které mají 200 nukleotidů nebo více. Přestože se jejich role v epigenetice stále určuje, existují důkazy naznačující, že ncRNA se kromě umlčování genů účastní metylace DNA a modifikace histonů. Bylo prokázáno, že siRNA a lncRNA regulují genovou expresi tvorbou heterochromatinu [76].

Nejznámější mechanismus RNAi je následující:

- 1) dsRNA (dvouvláknová RNA) je rozpoznána a následně rozštěpena specifickou endonukleázou zvanou DICER na krátké dvouřetězcové oligonukleotidy zvané siRNA.
- 2) siRNA se naváže na specifický proteinový komplex RISC (RNA-induced silencing complex), který způsobí rozdělení krátké dvoušroubovice siRNA na dva řetězce, z nichž se jeden specificky naváže na cílovou molekulu komplementární mRNA (messengerová RNA).
- 3) Takto vzniklý komplex vykazuje endonukleázovou aktivitu a je schopen navázanou mRNA rozštěpit (a znemožnit tak použít ji jako templát pro translaci). Fragmenty mRNA se odpojí a celý proces (od bodu 2) se může opakovat. Jedná se o způsob, jak

jedna molekula siRNA může pomoci vyhledat a inaktivovat mnoho molekul určité mRNA.

- 4) Specifická RNA-dependentní-RNA-polymeráza může využít jednotlivé řetězce siRNA, navázané na mRNA, jako primery a prodloužit dvouřetězcové úseky RNA. Ty se pak stanou substrátem pro DICER (viz bod 1) a cyklus se opakuje. Jedna molekula antisense RNA (nebo dsRNA) tak může zapříčinit likvidaci rozsáhlého počtu molekul mRNA.

Dalším typem antisense RNA, vyskytujícím se přirozeně v buňkách, je tzv. mikro RNA. Tyto molekuly jsou syntetisovány podle určitých nekódujících úseků DNA a mají podíl na potlačení exprese určitých genů. Obsahují vlásenkovité struktury, které jsou podobné dsRNA, a jsou proto štěpeny DICERem za vzniku siRNA, která se váže na RISC. Mohou zabránit translaci mRNA, která je k jednomu z řetězců komplementární [81].

Kromě umlčování genů se RNAi může podílet na dalších jevech regulace genů. Je známo, že interakce DNA/RNA ovlivňují metylaci DNA. Zdá se, že RNAi může také fungovat na této úrovni metylací cytosinů a také CpG sekvencí klasičtěji spojených s metylací. Pokud cílová sekvence sdílí homologii s promotorem, může dojít k umlčení transkripce prostřednictvím metylace. Navíc se zdá, že RNA interaguje s chromatinovými doménami, což může nakonec řídit metylaci DNA [82].

## **1.4 Molekulární a epigenetické markery karcinomu děložního čípku**

Protože se karcinom děložního čípku vyznačuje častým výskytem a vysokou mortalitou, jsou zapotřebí nové diagnostické metody detekující nádorové markery spojené s tímto onemocněním. Nádorové markery hrají u karcinomu děložního čípku roli při odhadu rozsahu onemocnění, jsou faktorem předpovídajícím prognózu a jsou i součástí vyšetřovacího algoritmu detekce recidiv základního onemocnění pacientek v dispenzární péči. Vlastnosti ideálního markeru jsou včasná detekce, citlivost na měnící se stadia onemocnění, minimálně invazivní odběr vzorků a minimální časová náročnost zpracování [83,84].

### **1.4.1 Nádorové markery v klinickém použití**

**SCCA** (antigen skvamózních buněk). Nejčastějším karcinomem děložního čípku je SCC. Zvýšená syntéza SCCA probíhá v maligních nádorech skvamózního epitelu. SCCA je definován jako složka smíšeného antigenu TA-4, prokázaném v séru u pacientek s karcinomem čípku děložního. Byly identifikovány dva homologní proteiny SCC1 a SCC2. Tyto antigeny byly charakterizovány jako serin proteinázové inhibitory, tzv. serpiny. Marker je velmi citlivý na kontaminaci slinami nebo potem během preanalytické fáze. Obvyklá

hodnota cut-off je kolem 1,5 µg/l. Vysoké hodnoty u neléčených nemocných s karcinomem děložního čípku jsou prognosticky významné pro odhad dalšího vývoje onemocnění. Příčiny zvýšení SCCA v séru u nemaligních lézí zahrnují nemaligní gynekologická onemocnění [85]. Kromě karcinomu děložního čípku byla jeho zvýšená exprese prokázána i u dalších skvamózních karcinomů jako je epidermoidní karcinom plic a nádor hlavy a krku [86].

V diagnostice karcinomu děložního čípku se používá také klasický nádorový marker; **CYFRA 21-1** (fragmenty cytokeratinu 19). Zvýšené hladiny CYFRA 21-1 korelují se systémem stagingu nádorů Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví (FIGO). Navíc zvýšená hladina CYFRA 21-1 po léčbě indikuje přítomnost reziduální nádorové tkáně, kterou lze použít k predikci recidivy onemocnění a může být užitečná u pacientů bez detekovatelného SCCA v séru [83,84].

Dále jsou vyšetřovány **cytokiny**. Ukázalo se, že v průběhu vzniku různých novotvarů často dochází k nadměrné a nekontrolované expresi cytokinových genů a jejich receptorů a také ke zvýšení syntézy těchto faktorů v buňkách orgánů ovlivněných neoplastickým procesem, stejně jako jejich produkce přímo neoplastickými buňkami. V diagnostice karcinomu děložního čípku se využívají mj. takové cytokiny jako: vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), stejně jako hematopoetické cytokiny, např. faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF), faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF), faktor kmenových buněk (SCF) a tumor nekrotický faktor (TNF-α) [83].

#### 1.4.2 Molekulární markery

Pokrok ve výzkumných metodách umožnil použití molekulárních markerů karcinogeneze v diagnostice malignit děložního čípku. Rychlý a nekontrolovaný růst, který charakterizuje životní cyklus rakovinných buněk, závisí na mnoha faktorech, včetně změn v genech souvisejících s řízením buněčného cyklu. Vývoj nádoru je ovlivněn mutacemi DNA, které vedou k poruchám buněčného růstu, diferenciaci, proliferaci, stárnutí a smrti. Molekulární studie vedly k detekci a identifikaci téměř 150 genů souvisejících s karcinogenezí, většina z těchto genů kóduje proteiny, které regulují buněčný cyklus, diferenciaci a apoptózu [83].

Mezi nejvýznamnější molekulární markery karcinogeneze patří tumor supresorový **protein p53**. Za normálních podmínek se tento protein podílí na regulaci buněčného cyklu, působí také antionkogenně, spouští apoptózu nevratně poškozených buněk. Genová mutace zbavuje protein p53 jeho kontroly nad buněčným cyklem, způsobuje nadměrnou expresi jeho

neaktivní formy a vede k onkogenezi. Inaktivaci také často způsobují virově kódované proteiny, jako je například onkoprotein HPV-E6. Vysoce riziková HPV-DNA byla detekována u naprosté většiny karcinomů děložního čípku, proto tyto novotvary exprimovaly onkoproteiny E6 a E7. Protein E6 produkovaný HPV-16 a HPV-18 se specificky váže na správný typ proteinu p53, což vede k jeho funkční inaktivaci a rychlé degradaci ubiquitinovou cestou [83].

**Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)** je intracelulární membránový protein, který zabraňuje apoptotické buněčné smrti. Je lokalizován na vnější membráně mitochondrií, v jaderném obalu, plazmatické membráně a endoplazmatickém retikulu. Nadměrná exprese Bcl-2 je přítomna u premaligních a maligních lézí děložního čípku. Může být tedy použit jako biomarker k zjištění závažnosti léze CIN [87,88].

**MCM proteiny (mini chromosome maintenance complex)** jsou důležitým prvkem iniciujícím a omezujícím replikaci DNA v eukaryotických buňkách. Jsou přítomny v buňkách během cyklu a zmizí, když buňka projde svým diferenciačním nebo klidovým stádiem. Proto mohou být citlivým a specifickým markerem neoplastického buněčného cyklu. Proteiny MCM jsou vysoce exprimovány na povrchu neoplastických epiteliálních buněk, ale na povrchu normálních buněk chybí [83].

**Telomeráza** je enzym fugující jako reverzní transkriptáza, který umožňuje prodlužování zakončení chromozomů zvaných telomery. Aktivace telomerázy je kritickým krokem v buněčné immortalizaci a rozvoji rakoviny. U rakoviny děložního čípku byla prokázána zvýšená aktivita telomerázy [89]. Při dělení buněk dochází k postupnému zkracování telomer. Nad určitým počtem dělení se telomery nemůžou dále zkracovat, což vede k chromozomální nestabilitě, stárnutí a buněčné smrti. Existují dvě telomerázové podjednotky: hTR (telomerasová podjednotka zodpovědná za buněčnou immortalizaci) a hTERT (aktivita katalytické reverzní transkriptázy), které představují DNA řetězec telomery. Telomeráza je aktivní pouze v zárodečných buňkách. Gen kódující telomerázu je v normálních buňkách neaktivní, ale v rakovinných je neustále aktivován a neustále stimuluje buňky k dělení. Rakovinové buňky mohou také začít produkovat telomerázu a usnadnit tak jejich intenzivní dělení [83].

Expres proteinu **Brn-3A** roste se stupněm pokročilosti cervikální neoplazie, což umožňuje jeho použití jako potenciálního markeru ve screeningových testech. Použití tohoto proteinu jako markeru však vyžaduje další výzkum [83].

### 1.4.3 Epigenetické markery

Epigenetika jsou změny genové exprese bez změny v sekvenci DNA. Související markery nebo mechanismy epigenetické regulace mohou výzkumníkům pomoci pochopit iniciaci a progresi karcinomu děložního čípku [84].

#### Metylace DNA u karcinomu děložního čípku

Epigenetika virových genomů HPV může být také spojena s karcinogenezí děložního čípku. Zvýšené hladiny metylace v některých genech korelují se závažností histologických stupňů. Hladina exprese metylace se zvyšuje od cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) k invazivní rakovině, zatímco v normální cervikální tkáni je nedetekovatelná. Proto mohou tyto markery sloužit jako biomarkery pro screening, prognózu a diagnostiku karcinomu děložního čípku (Tab. 2) [84].

**Tabulka 2:** Metylační markery pro karcinom děložního čípku [84]

Skupina	Geny a proteiny	Typ vzorku
Nádorový supresor	Adenylátcykláza 8 ( <i>ADCY8</i> )	Tkáň
	Cadherin 8 typ 2 ( <i>CDH8</i> )	Tkáň
	p53	Tkáň a krev
Protoonkogen	Cyklin A1 ( <i>CCNA1</i> )	Buněčná linie a tkáň
Apoptóza	Protein vázající receptor kyseliny retinové ( <i>RARB</i> )	Tkáň
Cytokin	Interferon gama (IFN- $\gamma$ )	Tkáň
	Interleukin 10 (IL-10)	Buněčná linie
Buněčný vývoj	Sekretagogy růstového hormonu ( <i>GHS-R</i> )	Buněčná linie
	Molekula buněčné adheze 1 ( <i>CADM1</i> )	Buněčná linie
	Kadherin-6 ( <i>CDH6</i> )	Tkáň

#### Modifikace histonu v karcinomu děložního čípku

Acetylace histonů genomu HPV 16 indukuje zvýšenou expresi genu HPV 16. Histonová deacetyláza (HDAC) je aktivátorem deacetylace histonů a je spojována s různými typy rakoviny. Nadměrná exprese HDAC1 (histon deacetyláza 1) inhibuje buněčnou proliferaci a také indukuje buněčnou senescenci v buňkách karcinomu děložního čípku [84]. Hlavní histonové modifikační markery jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3).

**Tabulka 3:** Histonové modifikační markery pro rakovinu děložního čípku [84]

Skupina	Geny a proteiny	Typ vzorku
Nádorový supresor	p53	Buněčná linie
Apoptóza	Receptor kyseliny retinové beta 2 ( <i>RARB2</i> )	Buněčná linie
	Lidská telomerázová reverzní transkriptáza ( <i>hTERT</i> )	Buněčná linie
Cytokin	Supresor cytokinové signalizace ( <i>SOCS</i> )	Buněčná linie a tkáň

## 2 CÍL PRÁCE

1. Cílem této práce bylo najít potenciální diagnostický a prognostický marker pro karcinom děložního čípku založený na analýze metylace DNA, který by se mohl vyšetřovat za použití neinvazivních metod.
2. Vybrat geny, jejichž deregulace pomocí DNA metylace hraje roli v karcinogenezi nádoru cervixu.
3. Zoptimalizovat vybrané metodiky sledující změny v metylaci DNA u vybraných genů.
4. Zjistit, jakým způsobem metylace vybraných genů koreluje se zaznamenanými klinicko-patologickými charakteristikami karcinomu děložního čípku.

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál a zařízení**

#### **3.1.1 Biologický materiál**

Pro naši analýzu byly použity vzorky tkáně děložního čípku fixované ve formalínu uložené v parafínu (FFPE). Skupinu tvořily vzorky získané od roku 2010 do roku 2020. Sbíraný soubor tvořil 70 vzorků odebraných z děložního čípku a 30 nenádorových kontrolních vzorků (odebraných od pacientek bez diagnózy nádorového bujení). Soubor byl ucelený a tvořily ho pouze spinocelulární karcinomy. Odběr tkání se prováděl při operačních výkonech, jako je hysterektomie (chirurgické odstranění dělohy) a konizace (odstranění části děložního hrdla).

Soubor vzorků byl získán z archivu Fingerlandova ústavu patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty v Hradci Králové. Všechny vzorky byly zkontrolovány a ověřeny zkušeným patologem (Prof. Jan Laco, Ph.D.). U vzorků byla určena HPV pozitivita a typ HPV viru. Tyto vzorky tkáně byly v různém stádiu onemocnění a hodnoceny podle TNM klasifikace (8.verze).

U každé pacientky byla zaznamenána data (Tab. 4), jako převedený věk v době diagnózy, typ vzorku (hysterektomie, konizát), typing (SCC), HPV typ, věk, grading, invaze do lymfatických cév, invaze do krevních cév, vaskulární invaze, perineurální šíření, šíření do poševní manžety, šíření do CK junkce, šíření do endometria, šíření do myometria, šíření do parametrií, přítomnost prekanceróz, typ prekanceróz, počet LU (lymfatické uzliny), lokalizace +LU, pT, pN (8.TNM) a stádium FIGO (2018).



**Tabulka 4:** Klinicko-patologická data zahrnutých pacientek s karcinomem děložního čípku

Klinicko-patologická data		n	Počet	%
Věk	≤ 50	62	30	48
	> 50		32	52
Typ vzorku	hysterektomie	62	41	66
	konizát		21	34
HPV typ	vysoce rizikový	44*	33	75
	nízce rizikový		11	25
Grading	G1	62	3	5
	G2		46	74
	G3		13	21
Invaze	do lymfatických cév	ano	16	70
		ne	7	30
	do krevních cév	ano	3	13
		ne	20	87
Šíření	perineurální	ano	6	10
		ne	56	90
	do poševní manžety	ano	4	8
		ne	49	92
	do CK junkce	ano	12	22
		ne	42	78
	do endometria	ano	6	11
		ne	48	89
	do myometria	ano	7	13
		ne	47	87
	do parametrií	ano	8	15
		ne	46	85
jinam	ano	4	7	
	ne	51	94	
Prekanceróza	ano	62	53	85
	ne		9	15
Prekanceróza typ	HSIL	CIN I	1	2
		CIN III	51	96
	LSIL	1	2	
Počet přítomných LU	≤ 30	45*	36	80
	> 30		9	20
TNM klasifikace (8.vydání)	pT	T1	53	85
		T2	9	15
	pN	pN0	43	93
		pN1	3	7
FIGO stadium (2018)	I	62	51	82
	II		6	10
	III		5	8

\* V těchto případech nejsou dílčí součty vztaheny k celkovému počtu zapojených pacientů z důvodu nedostatku poskytnutých dat.

### 3.1.2 Kity

- FFPE RNA/DNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek, Kanada, Ontario, Thorold)
- EZ DNA Methylation – Gold Kit (Zymo Research, Californie, Irvine, USA)
- Qubit dsDNA BR Assay Kit, Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA)

### 3.1.3 Chemikálie

- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika)
- gb HRM PCR Master Mix 2x (Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové, Česká republika)
- Gold polymeráza (AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Gold Buffer and MgCl<sub>2</sub>; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- DNTP (2,5 mM každý) (Takara Bio, Kusacu, Prefektura Šiga, Japonsko)
- Etanol (96 %)
- voda pro molekulární biologii (Rnase free)
- Primery (syntetizované ve firmě Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové, Česká republika)
- SYTO-9 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA)
- StainIN™ RED Nucleic Acid Stain (highQu GmbH, Kraichtal, Německo) interkalační barvivo Ethidium bromid 10x ředitelné (SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Německo)
- Tris-borát-EDTA (TBE) pufr

### 3.1.4 Laboratorní pomůcky a přístroje

- Orbitální třepačka MS 3 basic (IKA-Werke; Staufen im Breisgau, Německo)
- Centrifuga/vortex Combi-Spin (Biosan; Riga, Lotyšsko)
- Termoblok Bio TDB-100 (Biosan; Riga, Lotyšsko)
- Bloková digitální lázeň pro mikrozkušavky BTD (Grant Instruments (Cambridge) Ltd; Cambridgeshire, Velká Británie)
- Termocyklér C1000 touch (Bio-Rad Laboratories; Hercules, Kalifornie, USA)
- Termocyklér Veriti® (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA)
- Centrifuga Heraeus Multifuge 3S (Heraeus Holding GmbH; Hanau, Německo)
- Centrifuga 5430 R (Eppendorf; Hamburk, Německo)
- Pipety (0,5 µl – 1000 µl) (Eppendorf; Hamburk, Německo)

- Dávkovač Multipette® E3 (Eppendorf; Hamburk, Německo)
- nástavce na dávkovač Multipette® E3 (Eppendorf; Hamburk, Německo)
- Eppendorf zkumavky (1,5 ml) (Eppendorf; Hamburk, Německo)
- Eppendorf zkumavky safe-lock (Eppendorf; Hamburk, Německo)
- 96 jamková real-time PCR destička bílá (Bio Rad Laboratories; Hercules, Kalifornie, USA)
- CFX Connect Real-Time PCR detekční systém (Bio-Rad Laboratories; Hercules, Kalifornie, USA)
- Qubit® Fluorometer (v1.0) (Invitrogen; Waltham, Massachusetts, USA)
- Spektrofotometr / Fluorometr řady DS-11 (DeNovix Inc.; Wilmington, Delaware, USA)
- Mini Gel System B1 – Owl (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA)

## 3.2 Metodika

### 3.2.1 Zpracování a vyhodnocení TCGA dat

Na základě literární rešerše byly nalezeny geny s prokázanou metylací u karcinomu děložního čípku. U těchto genů byla ověřena metylace v projektu Atlas rakovinového genomu (TCGA) [90] prohlížečem Mexpress [91]. TCGA data detailně geneticky charakterizují nejčastější typy zhoubných nádorů. Dle výsledků TCGA dat byly vybrány 2 geny, kde byla potvrzena metylace v jejich promotorové oblasti a korelovala se sníženou expresí daných genů. Pro další analýzu byly vybrány geny *ASCL1* a *SLIT2*.

### 3.2.2 Izolace DNA z parafínu

Z FFPE bločků vzorků karcinomu cervixu byly získány ruličky o tloušťce ~ 5 µm. Pro izolaci nukleových kyselin bylo použito 5 ruliček u každého vzorku.

Kolonková izolace DNA (Obr. 9) ze vzorků uložených v parafínových bločcích byla provedena dvojitým kitem FFPE RNA/DNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek). Tento kit poskytuje rychlý způsob pro izolaci a purifikaci genomové DNA, pocházející z formalínem fixované tkáně zalité v parafínu (FFPE). Postup byl proveden podle pokynů výrobce.

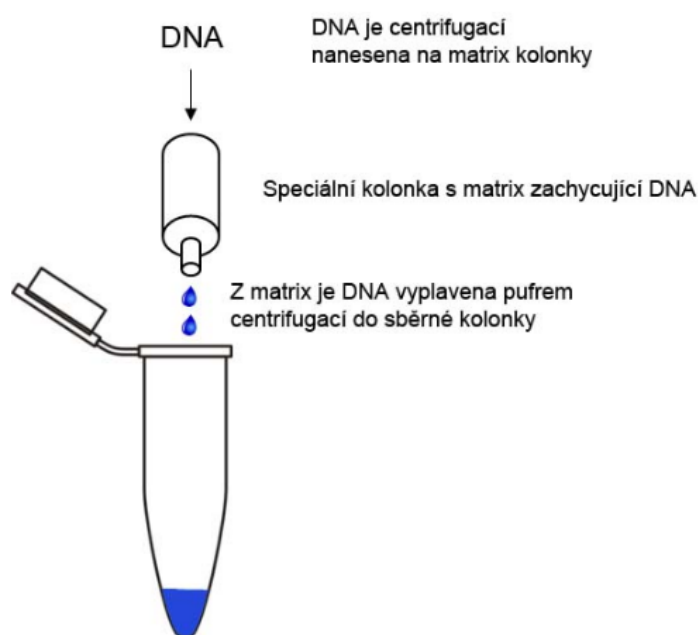
V případě tkáně FFPE musely být vzorky nejprve zbaveny parafínu za použití xylenu a přečištěny 96 % ethanolem. Následovala inkubace při vyšší teplotě pro zabránění vzniku cross-linků. Lyzát, který se nejdříve získal rozrušením tkání a buněk, a působením proteázy se nanesl do speciálních kolonek. V kolonce byla přítomna matrix, na kterou je schopná se DNA

navázat a centrifugací kolonky se následně roztok (bez DNA) odplavil pryč. Následující kroky vedly k pročištění získané DNA, které byly zakončeny elucí DNA. Eluce vzorků s tumory byla provedena do objemu 50 µl a u kontrolních vzorků do 30 µl.

Postup:

1. Ke vzorku bylo přidáno 1ml xylenu, následoval důkladný vortex.
2. Vzorky s xylenem byly inkubovány v termobloku 5 minut na 50 °C a poté centrifugovány 2 minuty při 14 000 x g. Následně byl přenastaven termoblok na 80 °C.
3. Opatrně se odpipetoval supernatant do organického odpadu.
4. Přidal se 1ml 96 % ethanolu, proběhl vortex a centrifugace po dobu 2 minuty při 14 000 x g.
5. Opatrně se odpipetoval supernatant do organického odpadu.
6. Krok 4-5 se opakoval. Odstranil se přebytečný ethanol tenkou špičkou.
7. Byl odpařen zbytkový ethanol v otevřené zkumavce při laboratorní teplotě po dobu 10 minut (nebo do odpaření veškerého ethanolu).
8. K vysušené tkáni bylo přidáno 300 µl digestion pufru A a 10 µl proteinázy K, následně byl vzorek zvortexován.
9. Inkubováno 15 minut při 55°C.
10. Inkubováno na ledě 3 minuty.
11. Následovala centrifugace vzorků 3 minuty při 14 000 x g.
12. Opatrně byl odsát supernatant bez porušení pelety.
13. Peleta z kroku 12 se rozpustila ve 300 µl digestion pufru A, a bylo přidáno 10 µl proteinázy K a vortexováno.
14. Inkubovat 1 hodinu při 55°C. Občasný vortex.
15. Inkubovat 2 hodiny při 90°C. Občasný vortex.
16. Inkubovat 3 minuty na ledě.
17. Přidalo se 300 µl RL pufru a následovalo vortexování. Následně bylo přidáno 250 µl 96 % ethanolu a znovu proběhl vortex.
18. Přesunulo se 600 µl na kolonku (v kitu, DNA purification micro columns) a centrifugovalo se 1 minutu při 14 000 x g. Supernatant byl vylit.
19. Opakoval se krok 18, dokud přes kolonku neprošla všechna směs.
20. Přidalo se 600 µl Wash solution A, následovala centrifugace 1 minutu při 14 000 x g. Vylil se proteklý obsah.
21. Opakoval se 2x krok 20.

22. Kolonka se přesunula do nové sběrné tuby a vložila se do centrifugy na 5 minut při 16 000 x g; filtr se vysušil.
23. Přesunula se kolonka do nové 1,5ml zkumavky se zámečkem, přidalo se 20-50  $\mu$ l ATE pufru a nechalo se inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě. Následně se centrifugovalo 1 minutu při 14 000 x g. Nevyhazovat kolonku!
24. Kolonka byla přesunuta do nové 1,5ml zkumavky se zámečkem, přidalo se 20  $\mu$ l elučního pufru F, inkubovalo se 1 minutu a centrifugovalo 1 minutu při 14 000 x g.
25. Vzorky byly označeny štítkem a uchovány při -20 °C v mrazáku.



**Obrázek 9:** Schéma kolonkové metody k izolaci DNA [92]

### 3.2.3 Kontrola čistoty a kvality DNA

Důležitým krokem bylo ověřit si, že eluát po izolaci obsahuje dostatečné množství kvalitní DNA. Čistota a koncentrace extrahované DNA byla zkoumána spektrofotometricky na spektrofotometru DeNovix. Jako slepý vzorek byl použit eluční pufr F o objemu 2  $\mu$ l. Dále byly postupně ve stejném objemu nanášeny vzorky. Pro hodnocení čistoty byla měřena absorbance při 260 nm, 280 nm a 230 nm. Absopční poměry 260/280, 260/230 se používají ke stanovení čistoty DNA a přítomnosti kontaminantů ve vzorcích, které mohly vzniknout během procesu extrakce DNA [93].

DNA je považována za čistou, pokud byl poměr  $A_{260}/A_{280}$  mezi hodnotami 1,8 a 2,0 hodnota poměru  $A_{260}/A_{230}$  by měl být mezi 2,0 – 2,2.

Množství genomické dsDNA byla poté kvantifikována na Qubit® 1.0 Fluorimeter. Tento přístroj umožňuje přesnou kvantifikaci dsDNA s využitím specifického fluorescenčního značení. Pro měřené roztoky byl do jedné zkumavky o objemu 1,5 ml připraven pracovní roztok. Pro každý vzorek bylo napipetováno 199  $\mu\text{l}$  Qubit™ dsDNA BR Buffer a 1  $\mu\text{l}$  Qubit™ dsDNA BR Reagent. Pro měření standardu bylo do připravených mikrozkuvek pipetováno 190  $\mu\text{l}$  připraveného pracovního roztoku. Do jedné zkumavky bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  Qubit™ dsDNA BR Standard #1, do druhé Qubit™ dsDNA BR Standard #2. Pro měření vzorku bylo do mikrozkuvky napipetováno 198  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku a 2  $\mu\text{l}$  DNA izolátu. Mikrozkuvky byly krátce zvortexovány a zcentrifugovány. Po 2 minutách inkubace byla změřena koncentrace DNA. Vzorky byly poté uloženy do mrazáku při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro následnou bisulfitovou konverzi.

### 3.2.4 Bisulfitová konverze DNA

Všechny zkoumané vzorky byly podrobeny bisulfitovou konverzí. Bisulfitové ošetření genomické DNA je použito pro konverzi všech nemetylovaných cytosinů na uracil, přičemž metylované cytosiny zůstanou nedotčeny. Bisulfitová konverze byla provedena pomocí kitu EZ DNA Methylation-Gold Kit. Postupovalo se podle návodu výrobce. Všechny kroky bisulfitové konverze, pokud v návodu nebylo uvedeno jinak, byly provedeny při pokojové teplotě. Vstupní množství DNA bylo vypočítáno podle vzorce uvedeného níže pro jednotlivé vzorky, aby požadované množství DNA v reakci bylo 500 ng.

$$\text{Objem DNA } [\mu\text{l}]: V_{DNA} = \frac{500}{\text{naměřená koncentrace DNA } [\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}]}$$

$$\text{Objem DNase free vody } [\mu\text{l}]: V_{H_2O} = 20 - V_{DNA}$$

K eluci DNA bylo použito 15  $\mu\text{l}$  (u vzorků s koncentrací  $<20\text{ ng}/\mu\text{l}$  eluce do 10  $\mu\text{l}$ ) elučního pufu. Získaná konvertovaná DNA byla uložena v mrazáku při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Postup:

1. Příprava master mixu CT Conversion Regent - do zkumavky bylo přidáno 900  $\mu\text{l}$  vody, 300  $\mu\text{l}$  M-Dilution pufu a 50  $\mu\text{l}$  M-Dissolving pufu.
2. Zkumavky musely být pečlivě zvortexovány - ve zkumavce nesmí být přítomny viditelné nerozpuštěné kusy. Nechali jsme rozpouštět během ředění vzorku.

3. Vstupní množství DNA bylo vypočítáno podle vzorce pro jednotlivé vzorky, aby požadované množství DNA v reakci bylo 500 ng. Konečný objem byl 20  $\mu$ l. Byly použity zkumavky o velikosti 0,2 ml.
4. Do každé zkumavky bylo přidáno 130  $\mu$ l CT Conversion Reagent mixu, promíchalo se pipetováním.
5. Směs byla rozdělena na dva stejné alikvoty (20  $\mu$ l ředěné DNA + 130  $\mu$ l master mixu = 150  $\mu$ l). Bylo potřeba udělat dva alikvoty po 75  $\mu$ l. Cykler neumí zahřát zkumavky na objem 150  $\mu$ l, proto bylo třeba je rozdělit na polovinu.
6. Zkumavky byly přemístěny do cykleru a nastavil se program Bisulfite conversion (Tab. 5).
7. Připravili jsme si kolonky. Na každou kolonku bylo přidáno 600  $\mu$ l M-Binding pufru, do kterého se přidaly oba alikvoty vzorků. V každé kolonce tedy bylo 600  $\mu$ l pufru + 75  $\mu$ l + 75  $\mu$ l alikvotů. Následně byly zkumavky promíchány přetočením. Centrifugace 30 s při 20 000 x g. Vylít proteklý obsah.
8. Přidat 100  $\mu$ l M-Wash pufru na kolonku. Centrifugace 30 s při 20 000 x g.
9. Přidat 200  $\mu$ l M-Desulphonation pufru na kolonku a nechat inkubovat na 15-20 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci centrifugace na 30 s při 20 000 x g.
10. Přidat na kolonku 200  $\mu$ l M Wash pufru, centrifugace 30 s při 20 000 x g.
11. Opakovat krok 11.
12. Přemístit kolonku do nové 1,5 ml zkumavky se zámečkem. Přidat 10/15  $\mu$ l (dle protokolu, poslední sloupeček) M-Elution pufru na filtr (nedotýkat se filtru špičkou!) Centrifugace 30 s při 16 000 x g.
13. Vzorky byly označeny štítky a uchovány na -20 °C v mrazáku v laboratoři.

**Tabulka 5:** Teplotní profil pro bisulfitovou koverzi

<b>Krok</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas [min]</b>
1	98	10
2	64	150
3	4	$\infty$

### 3.2.5 Navržení a syntéza specifických PCR primerů

Bylo potřeba navrhnout primery komplementární k oblasti templátu DNA. Pro PCR byly navrženy HRM primery v párech – přední, tzv. „forward“ primer a zadní tzv. „reverse“ primer. Pro gen *ASCL1* byly navrženy 2 páry primerů a pro gen *SLIT2* byl navrhnut 1 pár primerů. Primery byly navrženy za použití volně dostupného programu MethPrimer (1.0) [94] s ohledem na skutečnost, že FFPE DNA je vysoce fragmentovaná a amplikony delší než 200 bp mají za následek nižší rozlišení tání. Primery byly syntetizovány v biotechnologické společnosti Generi Biotech v Hradci Králové [95].

V obvyklém zápisu sekvence DNA se zapisuje horní vlákno z dvouřetězcové molekuly DNA, a to ve směru 5'→3'. Primery se navrhovaly podle sekvence vlákna. Sekvence předního primeru je totožná se sekvencí horního vlákna. Přední primer umožňuje syntézu horního vlákna podle templátového spodního vlákna. Zadní primer se navrhoval jako komplementární sekvence k hornímu vláknu, která byla zapisovaná ve směru 3'→5'. Proto při navrhování sekvence zadního primeru podle horního řetězce, jsme museli sekvenci primeru číst odzadu. Zadní primer umožňuje syntézu dolního vlákna podle templátového horního vlákna. Při navrhování sekvence primerů jsme dbali na to, aby oba primery měly přibližně stejnou teplotu nasedání. Právě teplota nasedání umožňuje primerům nasednout na DNA (Tab. 6) [96].

Sekvence primerů od 5'-konce k 3'-konci pro amplifikaci genu *ASCL1\_1* (Primer ASCL1 HRM F1; Primer ASCL1 HRM R1) pro tuto diplomovou práci:

- Přední (forward) primer: TAGAGTTATTTGTTTTTTTTGTGA
- Zadní (revers) primer: AACTCTCCATTCAACTAAATTTATTA

Sekvence primerů od 5'-konce k 3'-konci pro amplifikaci genu *ASCL1\_2* (Primer ASCL1 HRM F2; Primer ASCL1 HRM R2) pro tuto diplomovou práci jsou následující:

- Přední (forward) primer: GTTGGGTGTTTTATTGAAAAGG
- Zadní (revers) primer: AACTATTTTTATTATTTTATTAACTCCC

Sekvence primerů od 5'-konce k 3'-konci pro amplifikaci genu *SLIT2* (Primer SLIT2 HRM F; Primer SLIT2 HRM R) pro tuto diplomovou práci jsou:

- Přední (forward) primer: TTTTAATTTTGGTTTTTGTTTTTTA
- Zadní (revers) primer: AAAAAATATCCACTAATCAACACTC



**Tabulka 6:** Parametry navržených primerů pro jednotlivé geny

Název genu	Velikost produktu [bp]	Teplota tání [°C]	Počet CpG míst v produktu
<i>ASCL1_1</i>	157	67,8	13
<i>ASCL1_2</i>	163	76,1	8
<i>SLIT2</i>	155	64,8	5

### 3.2.6 Optimalizace real-time PCR

Byly navrženy tři páry primerů pro dva rozdílné geny (*ASCL1* a *SLIT2*). Lyofilizované primery se rozpustily ve výrobcem daném množství vody, aby bylo dosaženo koncentrace 100  $\mu$ M (zásobní roztok). Pro samotnou reakci byly primery dále naředěny na koncentraci 10  $\mu$ M.

Následně byla nutná optimalizace k určení vhodné teploty pro nasedání primerů na templátovou DNA (tzv. annealing). Zkoušené teploty nasedání primerů byly 61.4 °C, 59 °C, 57 °C, 55 °C. Volba správné teploty byla také důležitá pro získání dostatečného množství produktů a zabránění tvorbě dimerů a nespecifických produktů.

1. **První fáze optimalizace** byla provedena na Master Mix Top Bio. Reagencie (Tab. 7) a teplotní profil (Tab. 8) při přípravě Master Mixu jsou uvedeny v tabulkách. Byly použity vzorky směsné gDNA a kontroly (směs kontrolních vzorků, směs tumorů, metylovaná kontrola, 10 % metylovaná kontrola, nemetylovaná kontrola, negativní kontrola).
2. **Druhá fáze optimalizace** byla provedena na Master Mix Generi. Reagencie (Tab. 9) a teplotní profil (Tab. 10) při přípravě Master Mixu jsou uvedeny v tabulkách.
3. **Třetí fáze optimalizace** byla provedena na Master Mix Gold. Reagencie (Tab. 11) a teplotní profil (Tab. 12) při přípravě Master Mixu jsou uvedeny v tabulkách.

Optimalizace primerů neprobíhala pomocí klasické gradientové PCR, ale přímo v přístroji real-time CFX, který umožňuje gradientovou PCR. Délka fragmentů a nepřítomnost primer/dimer byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy.

**Tabulka 7:** Složení směsí pro přípravu real-time PCR s použitím Master Mixu Top Bio, BC  
DNA – bisulfiticky konvertovaná DNA, CC - karcinom děložního čípku

Složka	Počet reakcí	
	1	4,4
	Objem [μl]	
voda	2,5	11
qPCR SYTO-9 Master Mix 2x	5	22
Primer ..._HRM_...F (10 μM)	0,75	3,3
Primer ..._HRM_...R (10 μM)	0,75	3,3
	9	39,6
Vzorek 1 μl směsné BC DNA z CC		

**Tabulka 8:** Teplotní profil PCR při optimalizaci nasedání primerů za použití Master Mixu  
Top Bio

Teplotní profil pro CFX			
Krok	Teplota [°C]	Čas	
Počáteční denaturace	94	5 min	
PCR cyklování 40x	Denaturace	94	60 s
	Annealing	<b>55-61,4</b>	30 s
	Extenze	72	30 s
Denaturace	95	2 min	
HRM analýza	50	20 s	
	<b>55-95</b>	5 s	incr. 0.2°C
Ochlazení	40	1 min	

**Tabulka 9:** Složení směsí pro přípravu real-time PCR s použitím Master Mixu Generi, BC  
DNA – bisulfiticky konvertovaná DNA, CC - karcinom děložního čípku

Složka	Počet reakcí	
	1	6,4
	Objem [μl]	
voda	2,5	16
gb HRM PCR Master Mix 2x	5	32
Primer ..._HRM_...F (10 μM)	0,75	4,8
Primer ..._HRM_...R (10 μM)	0,75	4,8
	9	57,6
Vzorek 1 μl směsné BC DNA z CC		

**Tabulka 10:** Teplotní profil PCR při optimalizaci nasedání primerů za použití Master Mixu  
Generi

<b>Teplotní profil pro CFX</b>			
<b>Krok</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	
Počáteční denaturace	95	3 min	
PCR cyklování 40x	Denaturace	95	5 s
	Annealing	<b>57</b>	10 s
	Extenze	72	20 s
Denaturace	95	2 min	
HRM analýza	50	20 s	
	<b>55-85</b>	5 s	incr. 0.2°C
Ochlazení	40	1 min	

**Tabulka 11:** Složení směsi pro přípravu real-time PCR s použitím Master Mixu Gold, BC  
DNA – bisulfíticky konvertovaná DNA

<b>Složka</b>	<b>Počet reakcí</b>	
	1	6,4
	<b>Objem [μl]</b>	
voda	4,8	30,72
Reaction Buffer (II, bez MgCl <sub>2</sub> ) 10x	1	6,4
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1	6,4
dNTPs	0,8	5,12
Primer SLIT2_HRM_F (10 μM)	0,5	3,2
Primer SLIT2_HRM_R (10 μM)	0,5	3,2
SYTO9 100x řed.	0,3	1,92
Gold polymerase	0,1	0,64
	Σ	9
	<b>BC DNA</b>	1
	Σ	10

**Tabulka 12:** Teplotní profil PCR při optimalizaci nasedání primerů za použití Master Mixu Gold

<b>Teplotní profil pro CFX</b>			
<b>Krok</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	
Počáteční denaturace	95	3 min	
PCR cyklování 40x	Denaturace	95	5 s
	Annealing	57	10 s
	Extenze	72	20 s
Denaturace	95	2 min	
HRM analýza	50	20 s	
	55-85	5 s	incr. 0.2°C
Ochlazení	40	1 min	

### 3.2.7 Kvantitativní PCR pro detekci metylace

Metylovaná DNA a nemetylovaná DNA získávají po zpracování bisulfitem různé sekvence, což vede k produktům PCR s výrazně odlišnými profily tání. Použili jsme PCR k amplifikaci metylovaných i nemetylovaných sekvencí a hodnotili jsme je metodou MS-HRM (methylation-sensitive high-resolution melting) pro určení rozsahu metylace v oblasti promotoru u genu *ASCL1*. Vyhodnocení metylace vzorků proběhlo za použití softwaru Bio-Rad CFX Maestro 2.0 a Bio-Rad Precision Melt Analysis Software 1.3.

Metylačně specifické tání s vysokým rozlišením využívá vlastností fluorescenční barvy, v našem případě SYTO-9, která se po navázání na dvouvláknovou DNA stává silně fluorescentní. Během postupného zahřívání dochází k meltingu (denaturaci) DNA a barva se z jednořetězců uvolňuje, což se projevuje poklesem fluorescence.

Ke stanovení procenta metylace vzorku byla použita jako standard plně metylovaná a plně nemetylovaná DNA, které byly smíchány v určitých poměrech a od nichž jsme stupeň metylace odečítali. My jsme si vytvořili 10 %, 25 % a 50 % kontrolu.

#### Postup:

1. Byl připraven Mastex Mix, který obsahoval reagenční podle uvedené tabulky níže pro každý amplikon (Tab. 13, 15).
2. Do jednotlivých jamek PCR destičky bylo pipetováno 9  $\mu$ l Master Mixu a 1  $\mu$ l analyzované DNA.
3. Destička byla překryta fólií, krátce stočena na centrifuze a vložena do termocykléru s nastaveným programem (Tab. 14, 16).

**Tabulka 13:** Reagencie při MS-HRM pro amplicon ASCL1\_1

Složka	Počet reakcí	
	1	59
	Objem [μl]	
voda	2,50	147,5
qPCR SYTO-9 Master Mix 2x	5	295
Primer ASCL1_HRM_F1 (10 μM)	0,75	44,25
Primer ASCL1_HRM_R1 (10 μM)	0,75	44,25
Σ	9	531
Vzorek	<b>1 μl BC DNA</b>	

**Tabulka 14:** Teplotní profil pro amplicon ASCL1\_1

Teplotní profil pro CFX			
Krok		Teplota [°C]	Čas
Počáteční denaturace		94	5 min
PCR cyklování 40x	Denaturace	94	60 s
	Annealing	<b>57</b>	30 s
	Extenze	72	30 s
Denaturace		95	2 min
HRM analýza		50	20 s
		<b>55-85</b>	5 s
Ochlazení		40	1 min

**Tabulka 15:** Reagencie při MS-HRM pro amplicon ASCL1\_2

Složka	Počet reakcí	
	1	59
	Objem [μl]	
voda	2,50	147,5
gb HRM PCR Master Mix 2x	5	295
Primer ASCL1_HRM_F2 (10 μM)	0,75	44,25
Primer ASCL1_HRM_R2 (10 μM)	0,75	44,25
Σ	9	531
Vzorek	<b>1 μl BC DNA</b>	

**Tabulka 16:** Teplotní profil pro amplikon ASCL1\_2

<b>Teplotní profil pro CFX</b>			
<b>Krok</b>		<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>
Počáteční denaturace		95	3 min
PCR cyklování 40x	Denaturace	95	5 s
	Annealing	<b>57</b>	10 s
	Extenze	72	20 s
Denaturace		95	2 min
HRM analýza		50	20 s
		<b>55-85</b>	5 s
Ochlazení		40	1 min

### 3.3 Zpracování dat a statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu STATISTICA (softwarový systém pro analýzu dat) verze 14.0.15 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Provedený statistický test byl oboustranný a statistická významnost byla nárokována pro hodnotu  $P < 0,01$  nebo  $< 0,05$ . Vztah mezi metylací genů a dalšími nezávislými faktory byl analyzován pomocí metody Chí-kvadrát test a Fisherův exaktní test. Pro dvě kategorické proměnné byl použit Fisherův exaktní test a pro více kategorií Chí-kvadrát. Zároveň byla vytvořena heatmapa (Příloha A) pomocí programu GraphPad Prism v. 8.0.1, kde jsou hodnoty metylace reprezentovány na škále více barev.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Nejprve jsme na základě literární rešerše vyhledali geny s prokázanou metylací u karcinomu děložního čípku (Tab. 17). U těchto genů byla ověřena metylace v projektu TCGA dat prohlížečem Mexpress. Pro další analýzu jsme si vybrali 2 geny, *ASCL1* a *SLIT2*.

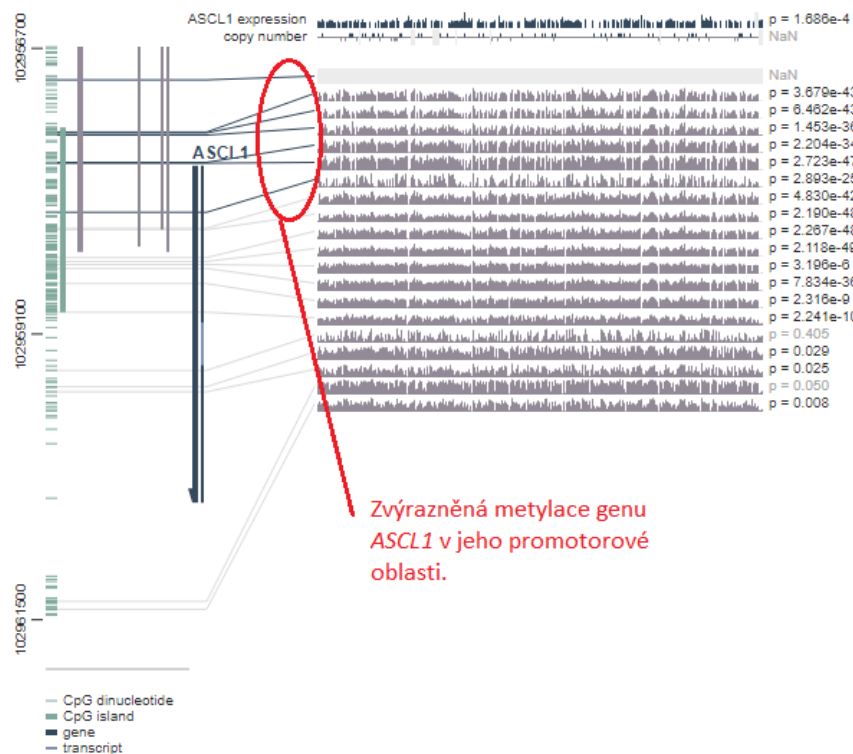
Gen *ASCL1* jsme si pro naši práci vybrali z důvodu jeho zvýšené metylace DNA u karcinomu děložního čípku, kterou ve své studii prokázal [97]. Zároveň se jeho hladiny metylace významně zvyšovaly se závažností onemocnění ve studii [98], což by z něj mohlo učinit vhodný biomarker pro včasnou diagnostiku.

Statisticky zvýšená metylace byla potvrzena i po analýze TCGA dat (Obr. 10)

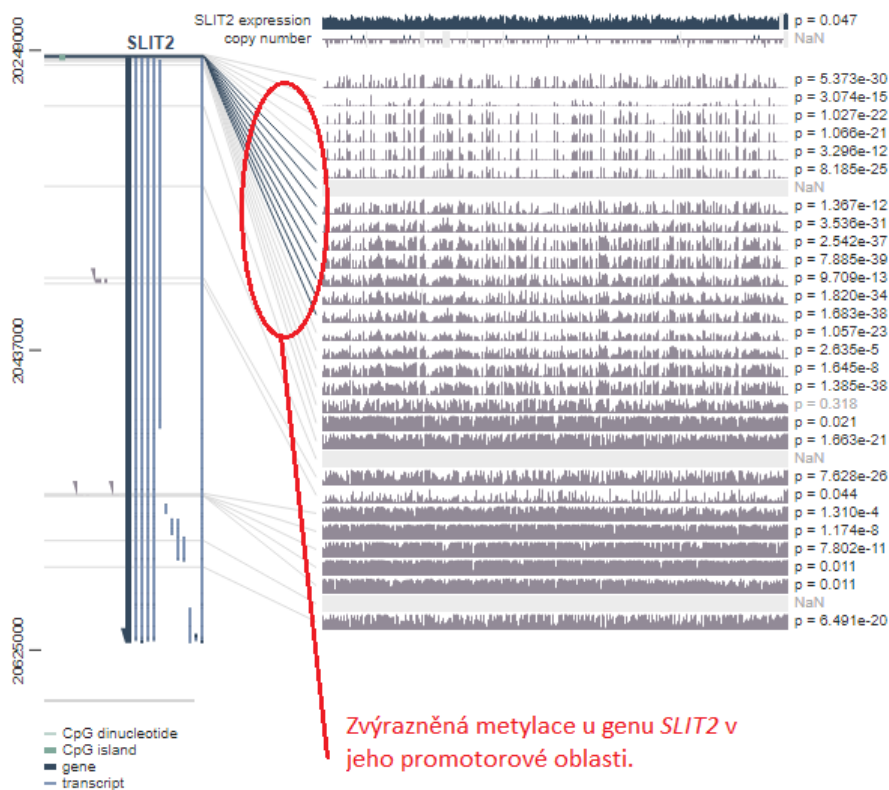
Gen *SLIT2* jsme si vybrali z důvodu jeho výrazně snížené exprese a mnohočetné metylace (52 %) lokalizované na chr. 4p15.31, u souboru pacientů s karcinodem děložního čípku ve studii [99]. Další publikovaný výzkum [100] ukázal, že gen *SLIT2* je tumor supresorový gen, který je inaktivován delekcemi a hypermetylací jeho promotorových oblastí u různých typů epitelálních tumorů, včetně karcinomu děložního čípku. Navíc odstranění *SLIT2* lokusu bylo spojeno se špatným přežitím u pacientek s karcinodem děložního čípku [101]. Statisticky zvýšená metylace byla potvrzena i po analýze TCGA dat (Obr. 11). Všechny výše uvedené důvody ukazují na jeho důležitý význam v cervikální tumorigenezi a je vhodným kandidátem pro naši analýzu.

**Tabulka 17:** Geny s prokázanou metylací v jejich promotorové oblasti

<b>Geny s prokázanou metylací u karcinomu děložního čípku</b>								
<i>ASCL1</i>	<i>DPYS</i>	<i>EPB41L3</i>	<i>HIC1</i>	<i>MAL</i>	<i>RARB</i>	<i>SLIT2</i>	<i>WIF1</i>	<i>ZNF582</i>



Obrázek 10: Znázorněna metylace genu *ASCL1* v jeho promotorové oblasti [upraveno dle 91]



Obrázek 11: Znázorněna metylace genu *SLIT2* v jeho promotorové oblasti [upraveno dle 91]



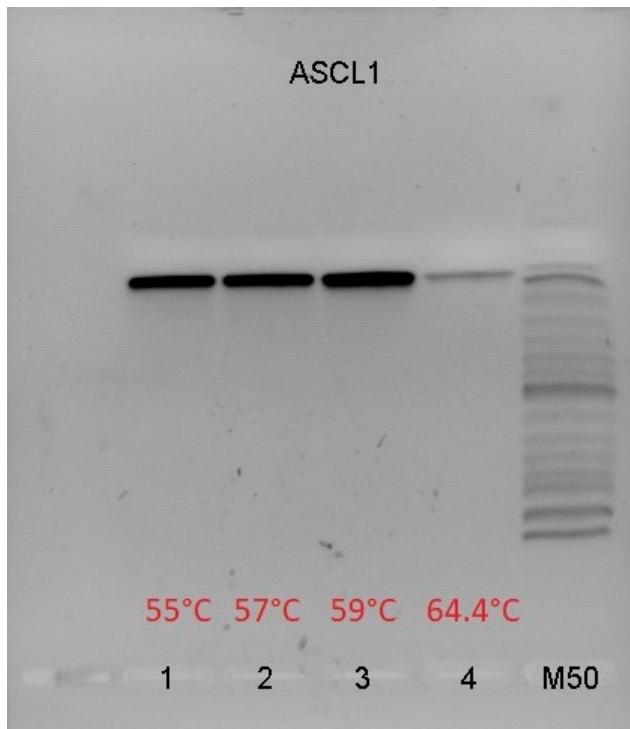
## 4.1 Výsledek optimalizace PCR

Cílem optimalizace bylo zajištění specifického průběhu PCR reakce, tak aby vznikal pouze jediný produkt odpovídající vybranému úseku pro amplifikaci. Optimalizace spočívala v určení vhodné teploty (annealing) pro nasedání primerů, při které nedochází k tvorbě vedlejších produktů v podobě primerů/dimerů.

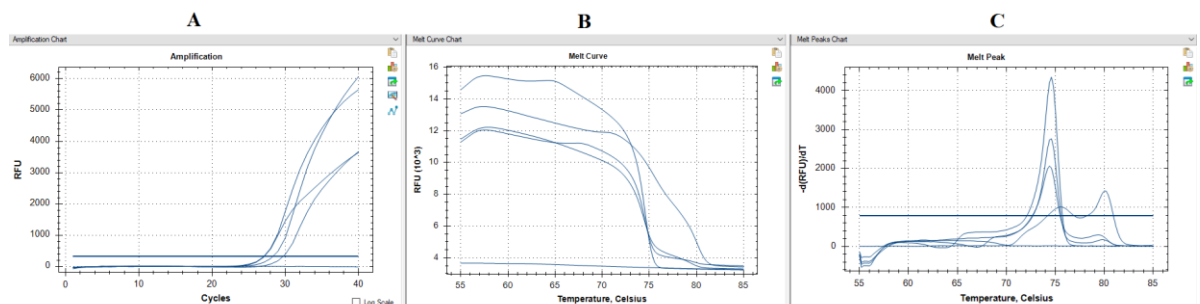
Jelikož všechny navržené primery nebylo možné zoptimalizovat na jeden master mix při použití gradientové PCR, byly zvoleny různé master mixy obsahující odlišné polymerázy. Při naší studii jsme použili 3 páry primerů (Master Mix Top Bio, Master Mix Generi a Master Mix Gold) pro 2 různé geny (*ASCL1* a *SLIT2*) pokrývající promotorovou oblast a oblast exonu 1 genů. Optimalizace teplot pro nasedání primerů byla při 61.4 °C, 59 °C, 57 °C, 55 °C. Délka amplifikačních produktů a nepřítomnost primer/dimer byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy (Obr. 12). Byl použit DNA marker o velikosti 50 bp. Na gelu se náš produkt nacházel mezi velikostmi 150 bp a 200 bp, což odpovídá předpokládané velikosti 163 bp, zároveň se potvrdila nepřítomnost primer/dimer.

Primery *ASCL1 HRM F1* a *ASCL1 HRM R1* se podařilo zoptimalizovat na Master Mix Top Bio. Ideální teplota annealingu byla stanovena na 57 °C. Primery *ASCL1 HRM F2* a *ASCL1 HRM R2* se podařilo zoptimalizovat na Master Mix Generi. Teplota annealingu byla stanovena na 57 °C. Třetí amplikon s primery *SLIT2 HRM F*; Primer *SLIT2 HRM R* se nepodařilo zoptimalizovat ani na jednu ze tří uvedených variant. Gen *SLIT2* byl tedy vyřazen z analýzy a v následujících krocích se s ním nepracovalo. Nepodařená optimalizace genu *SLIT2* může být zapříčiněna nevhodně zvolenou sekvencí primerů.

Úspěšnost optimalizace jsme zkontrolovali dle amplifikačních křivek a křivek tání (Obr. 13), zda v průběhu reakce vznikají nespecifické produkty či primery-dimery.



**Obrázek 12:** Výsledek teplotní gradientové PCR vizualizovaný na agarózovém gelu. Nepřítomnost primer/dimer, silný proužek produktu PCR na gelu.

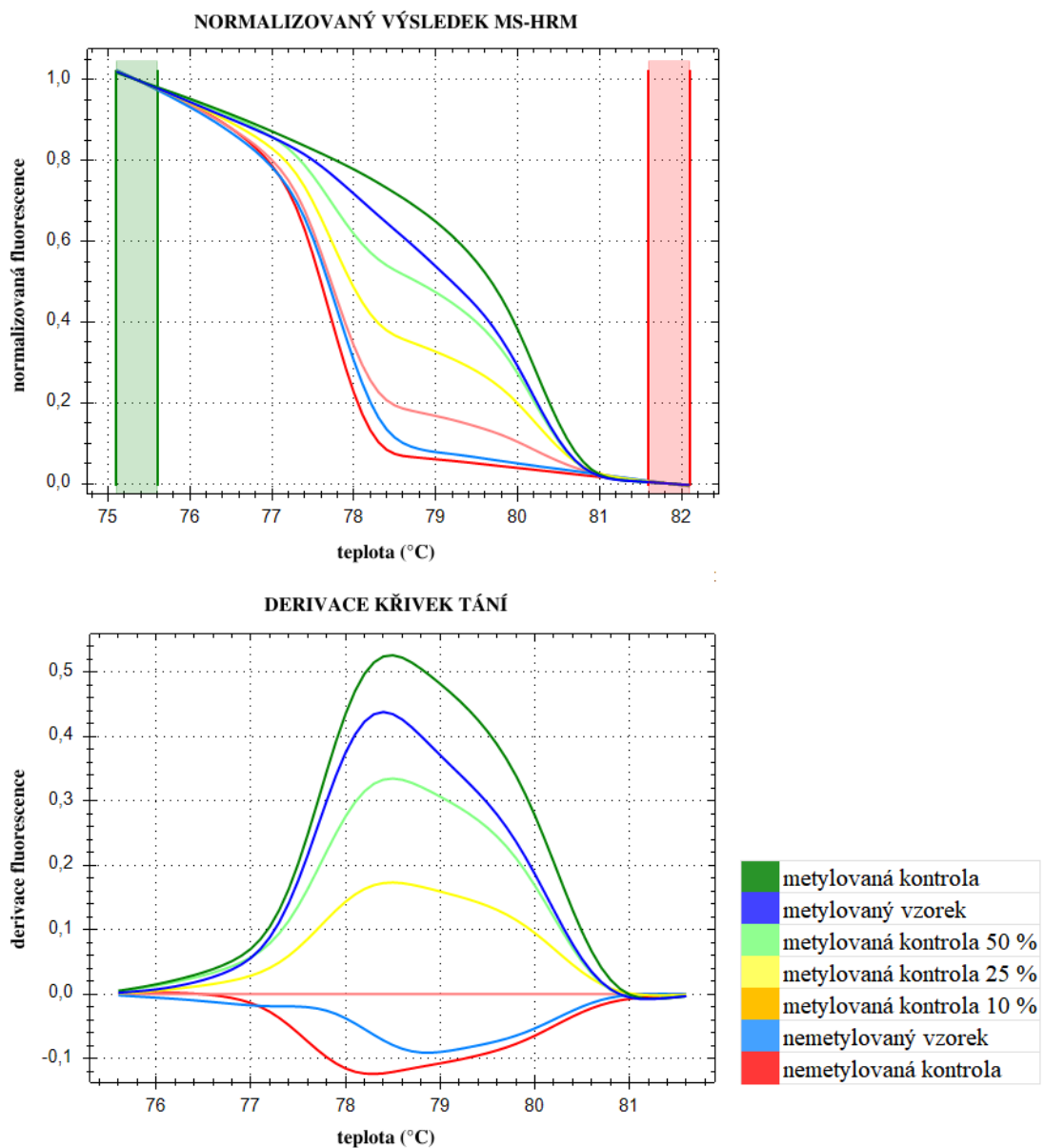


**Obrázek 13:** Amplifikační křivka (A) a křivka tání (B) a pík první derivatizace křivky tání při ideálním průběhu amplifikace u optimalizovaného amplikonu ASCL1\_1 na Master Mixu Top Bio. Byly použity vzorky po bisulfitové konverzi a jako kontrola posloužila metylovaná DNA, metylovaná DNA z 10 % a nemetylovaná DNA.

## 4.2 Výsledek MS-HRM analýzy

### Promotorová metylace amplikonu *ASCL1\_1* u karcinomu děložního čípku

Stav metylace amplikonu *ASCL1\_1* po bisulfitové konverzi DNA byl detekován pomocí metylačně specifické analýzy tání s vysokým rozlišením (MS-HRM) s použitím přístroje Bio-Rad CFX96 Touch™ v rozsahu 90 vzorků (62 vzorků odebraných z děložního čípku s nádorovým bujením a 28 nenádorových kontrolních vzorků bez diagnózy nádorového bujení). U zbylých 10 vzorků (8 vzorků s tumory a 2 kontroly) nebyla zaznamenána amplifikace. Vzorek jsme považovali za metylovaný, když detekovaná metylace byla nad mezní hodnotu 10 % (Obr. 14) (vyšší metylace než kontrola metylovaná z 10 %).



**Obrázek 14:** Reprezentativní grafy z MS-HRM amplikonu *ASCL1\_1*

Pomocí MS-HRM byla zjištěna statisticky významně vyšší přítomnost metylace sledované promotorové oblasti *ASCL1* ( $p=0,000$ ) u vzorků karcinomu děložního čípku v porovnání s nenádorovou tkání děložního čípku. Methylace promotorové oblasti u amplikonu *ASCL1\_1* byla detekována u 63 % (39 z 62) vzorků s tumory. Počet nemetylovaných vzorků s tumory byl 37 % (23 z 62). Všechny 28 kontrolních vzorků bylo nemetylovaných. Stupeň metylace byl dále klasifikován v jednotlivých úrovních: žádná (0 %), nízká (10-25 %), střední (25-50 %) a vysoká (> 50 %) (Tab. 18). Nejčastěji byl zaznamenán nízký stupeň metylace 40 % (25 z 62) u vzorků s nádorovým bujením. Statisticky významné bylo určení metylace pozitivní a negativní, ale úroveň metylace nekoreluje s klinickopatologickými parametry.

**Tabulka 18:** Stupeň metylace v jednotlivých kategoriích u amplikonu *ASCL1\_1*

Klinicko-patologická data		n	Počet	%	ASCL1_1 stav metylace		
					Nemet.	Met.	% Met
Stupeň metylace	žádná	62	23	37	23	0	0%
	nízká		25	40	0	25	100%
	střední		12	19	0	12	100%
	vysoká		2	3	0	2	100%

#### **Promotorová metylace amplikonu *ASCL1\_2* u karcinomu děložního čípku**

Stav metylace amplikonu *ASCL1\_2* po bisulfitové konverzi DNA byl detekován pomocí metylačně specifické analýzy tání s vysokým rozlišením s použitím přístroje Bio-Rad CFX96 Touch™ v rozsahu 90 vzorků (62 vzorků odebraných z děložního čípku s nádorovým bujením a 28 nenádorových kontrolních vzorků bez diagnózy nádorového bujení). U zbylých 10 vzorků (8 vzorků s tumory a 2 kontroly) nebyla zaznamenána amplifikace. Vzorek jsme považovali za metylovaný, když detekovaná metylace byla nad mezní hodnotu 10 %. Pomocí MS-HRM byla zjištěna statisticky významně vyšší přítomnost metylace sledované promotorové oblasti *ASCL1\_2* ( $p=0,000$ ) u vzorků karcinomu děložního čípku v porovnání s nenádorovou tkání děložního čípku. Methylace promotorové oblasti u amplikonu *ASCL1\_2* byla detekována u 65 % (40 z 62) vzorků s tumory. Počet nemetylovaných vzorků s tumory byl 35 % (22 z 62). Všechny 28 kontrolních vzorků bylo nemetylovaných. Stupeň metylace byl dále klasifikován v jednotlivých stupních: žádná (0 %), nízká (10-25 %), střední (25-50 %) a vysoká (> 50 %) (Tab. 19). Nejčastěji byl zaznamenán nízký stupeň metylace 40 % (25 z 62) u vzorků s karcinomy.

**Tabulka 19:** Stupeň metylace v jednotlivých kategoriích u amplikonu ASCL1\_2

Klinicko-patologická data		n	Počet	%	ASCL1_2 stav metylace		
					Nemet.	Met.	% Met
Stupeň metylace*	žádná	62	23	37	23	0	0%
	nízká		25	40	2	23	92%
	střední		12	19	0	12	100%
	vysoká		2	3	0	2	100%

### Specificita a senzitivita testu

Senzitivita neboli citlivost testu a specificita jsou dva důležité statistické údaje, které hodnotí kvalitu diagnostického testu. Pro amplikon ASCL1\_1 byla vyhodnocena senzitivita testu 0,73 (73 %) a specificita testu 1 (100 %). Pro amplikon ASCL1\_2 byla vyhodnocena senzitivita testu 0,74 (74 %) a specificita testu 1 (100 %). Senzitivita našeho testu při kombinaci obou amplikonů (ASCL1\_1 a ASCL1\_2) nabývá hodnoty 0,76 (76 %) a specificita testu pro nabývá hodnoty 1 (100 %). V tomto případě nemá velký význam kombinovat amplikony, protože výsledek testu se téměř shoduje s výpočty pro jednotlivé amplikony.

Senzitivita 76 % vyjadřuje úspěšnost, s níž test zachytí přítomnost sledovaného stavu. Specificita 100 % znamená, že test nebude pozitivní ani u jednoho vyšetřovaného zdravého člověka a všichni zdraví budou mít test negativní.

### 4.3 Korelace s klinicko-patologickými daty

Pro jednotlivé amplikony byl jejich stav metylace u vzorků karcinomu děložního čípku porovnán s klinicko-patologickými daty, které jsou shrnuty v tabulkách (Tab. 20,21). Za statisticky signifikantní rozdíly byly považovány korelace, kde p-hodnota byla <0,05. Střední věk (medián) v době diagnózy byl 52 let (rozmezí 25-76 let) u nádorové skupiny pacientek.

U amplikonu ASCL1\_1 byla pozorována signifikantně ( $p=0,05$ ) vyšší četnost metylace u pacientů, kterým byl odebrán vzorek tkáně při hysterektomii oproti konizaci. Byla pozorována vyšší četnost metylace u histopatologického gradingu ( $p=0,20$ ) G2 (60,9 %) a G3 (84,6 %). Zachycena byla především zvýšená metylace při invazi karcinomu do lymfatických cév ( $p=0,001$ ). Byla zaznamenána korelace šíření nádoru s metylací DNA do okolní tkáně, a to významně v případě šíření do CK junkce ( $p=0,002$ ), do endometria ( $p=0,038$ ), do myometria ( $p=0,024$ ) a do parametrií ( $p=0,015$ ). Vyšší korelace byla zjištěna u metylace DNA a TNM klasifikace ( $p=0,013$ ), kde vyšší četnost metylace byla pozorována u kategorie T2 (100 %) v porovnání s kategorií T1 (56,6 %). Pozorována byla signifikantně ( $p=0,019$ ) vyšší četnost metylace u FIGO stádia II (100 %) a III (100 %) oproti stádiu I (54,9 %).

U amplikonu **ASCL1\_2** byla zachycena především zvýšená metylace při invazi karcinomu do lymfatických cév ( $p=0,004$ ). Byla zaznamenána korelace šíření nádoru s metylací DNA do okolní tkáně, a to významně do CK junkce ( $p=0,014$ ), do endometria ( $p=0,038$ ), do myometria ( $p=0,024$ ) a do parametrií ( $p=0,015$ ). Methylace promotoru ASCL1\_2 byla významně asociována s karcinomy vyššího stupně T stádia u TNM klasifikace ( $p=0,016$ ), kde vyšší četnost metylace byla pozorována u kategorie T2 (100 %) v porovnání s karcinomy nižšího stádia T1 (58,5 %). Byla pozorována signifikantně ( $p=0,026$ ) vyšší četnost metylace u pacientů s FIGO stádiem II (100 %) a III (100 %) oproti stádiu I (56,9 %).

Ani u jednoho z amplikonů nebyla nalezena korelace mezi metylací DNA a věkem, HPV typem, invazí do krevních cév, s perineurálním šířením, šířením do poševní manžety, výskytem a typem prekanceróz, počtem přítomných lymfatických uzlin a kategorií pN.

**Tabulka 20:** Klinicko-patologická data porovnána s procentem (%) metylovaných vzorků u ampliconu ASCL1\_1

Klinicko-patologická data		n	Počet	%	ASCL1_1 stav metylace			p	
					Nemet.	Met.	% Met		
Věk	≤ 50	62	30	48	12	18	60%	0,647	
	> 50		32	52	11	21	65,6%		
Typ vzorku	hysterektomie	62	41	66	11	30	73,2%	<b>0,050</b>	
	konizát		21	34	12	8	38,1%		
HPV typ	vysoce rizikový	44*	33	75	9	24	72,7%	0,262	
	nízce rizikový		11	25	5	6	54,5%		
Grading	G1	62	3	5	3	0	0%	<b>0,020</b>	
	G2		46	74	18	28	60,9%		
	G3		13	21	2	11	84,6%		
Invaze	do lymfatických cév	ano	16	70	1	15	93,8%	<b>0,001</b>	
		ne	7	30	5	2	28,6%		
	do krevních cév	ano	3	13	0	3	100%	0,270	
		ne	20	87	6	14	70%		
Šíření	perineurální	ano	6	10	1	5	83,3%	0,276	
		ne	56	90	22	34	60,7%		
	do poševní manžety	ano	4	8	0	4	100%	0,092	
		ne	49	92	21	28	57,1%		
	do CK junkce	ano	12	22	0	12	100%	<b>0,002</b>	
		ne	42	78	21	21	50%		
	do endometria	ano	6	11	0	6	100%	<b>0,038</b>	
		ne	48	89	21	27	56,3%		
	do myometria	ano	7	13	0	7	100%	<b>0,024</b>	
		ne	47	87	21	26	55,3%		
do parametrií	ano	8	15	0	8	100%	<b>0,015</b>		
	ne	46	85	21	25	54,3%			
jinam	ano	55*	4	7	0	4	100%	0,103	
	ne	51	94	21	30	58,8%			
Prekanceróza	ano	62	53	85	20	33	62%	0,800	
	ne		9	15	3	6	67%		
Prekanceróza typ	HSIL	CIN I	53*	1	2	0	1	100%	0,670
		CIN III	51	96	20	31	61%		
	LSIL	1	2	0	1	100%			
Počet přítomných LU	≤ 30	45*	36	80	11	25	69%	0,463	
	> 30		9	20	1	8	89%	0,109	
TNM klasifikace (8.vydání)	pT	T1	62	53	85	23	30	56,6%	<b>0,013</b>
		T2		9	15	0	9	100%	
	pN	pN0	46*	43	93	17	26	60,5%	0,170
		pN1		3	7	0	3	100%	
FIGO stadium (2018)	I	62	51	82	23	28	54,9%	<b>0,019</b>	
	II		6	10	0	6	100%		
	III		5	8	0	5	100%		

\* V těchto případech nejsou dílčí součty vztaženy k celkovému počtu zapojených pacientů z důvodu nedostatku poskytnutých dat. \*\* Pokud je hodnota p menší, než 0,05, je korelace statisticky. Pokud je hodnota p menší než 0,001 korelace má vysokou statistickou významnost.

**Tabulka 21:** Klinicko-patologická data porovnána s procentem (%) metylovaných vzorků u ampliconu ASCL1\_2

Klinicko-patologická data		n	Počet	%	ASCL1_2 stav metylace			p	
					Nemet.	Met.	% Met		
Věk	≤ 50	62	30	48	11	19	63,3%	0,850	
	> 50		32	52	11	21	65,6%		
Typ vzorku	hysterektomie	62	41	66	12	29	70,7%	0,150	
	konizát		21	34	10	11	52,4%		
HPV typ	vysoce rizikový	44*	33	75	8	25	75,8%	0,180	
	nízce rizikový		11	25	5	6	54,5%		
Grading	G1	62	3	5	2	1	33,3%	0,330	
	G2		46	74	17	29	63,0%		
	G3		13	21	3	10	76,9%		
Invaze	do lymfatických cév	ano	23*	16	70	2	14	87,5%	<b>0,004</b>
		ne		7	30	5	2	28,6%	
	do krevních cév	ano		3	13	0	3	100%	
		ne		20	87	7	13	65%	
Šíření	perineurální	ano	62	6	10	2	4	66,7%	0,908
		ne		56	90	20	36	64,3%	
	do poševní manžety	ano	53*	4	8	0	4	100%	0,092
		ne		49	92	21	28	57,1%	
	do CK junkce	ano	54*	12	22	1	11	91,7%	<b>0,014</b>
		ne		42	78	20	22	52,4%	
	do endometria	ano	54*	6	11	0	6	100%	<b>0,038</b>
		ne		48	89	21	27	56,3%	
	do myometria	ano	54*	7	13	0	7	100%	<b>0,024</b>
		ne		47	87	21	26	55,3%	
do parametrií	ano	54*	8	15	0	8	100%	<b>0,015</b>	
	ne		46	85	21	25	54,3%		
jinam	ano	55*	4	7	0	4	100%	0,103	
	ne		51	94	21	30	58,8%		
Prekanceróza	ano	62	53	85	18	35	66,0%	0,540	
	ne		9	15	4	5	55,6%		
Prekanceróza typ	HSIL	CIN I	53*	1	2	0	1	100%	0,580
		CIN III		51	96	18	33	64,7%	
	LSIL	1		2	0	1	100%		
Počet přítomných LU	≤ 30	45*	36	80	9	27	75%	0,402	
	> 30		9	20	1	8	88,89%	0,109	
TNM klasifikace (8.vydání)	pT	T1	62	53	85	22	31	58,5%	<b>0,016</b>
		T2		9	15	0	9	100%	
	pN	pN0	46*	43	93	18	25	58,1%	0,151
		pN1		3	7	0	3	100%	
FIGO stadium (2018)	I		62	51	82	22	29	56,9%	<b>0,026</b>
	II			6	10	0	6	100%	
	III			5	8	0	5	100%	

\* V těchto případech nejsou dílčí součty vztaženy k celkovému počtu zapojených pacientů z důvodu nedostatku poskytnutých dat. \*\* Pokud je hodnota p menší, než 0,05, je korelace statisticky. Pokud je hodnota p menší než 0,001 korelace má vysokou statistickou významnost.



Výsledky jednotlivých částí naší práce jsme diskutovali s publikovanými studiemi.

Karcinom děložního čípku je druhým nejčastějším karcinomem u žen a nejčastějším gynekologickým karcinomem. V současné době se oblast genetiky nádorů vyvinula tak, že zahrnuje nový typ regulace za pomoci epigenetických změn. Rostoucí počet studií prokázal význam metylace DNA v expresi specifických genů a v progresi rakoviny děložního čípku. Stanovení profilů metylace DNA těchto genů může pomoci při včasné prevenci a diagnostice, sledování recidivy, prognóze a léčbě pacientek s rakovinou děložního čípku. V této práci jsme se zaměřili právě na jednu z těchto epigenetických změn, a to na metylaci promotorových oblastí námi vybraných genů za účelem najít vhodný diagnostický marker pro karcinom děložního čípku, který by mohl být případně vyšetřován neinvazivně a predikoval by chování karcinomu. Pro naši práci jsme si na základě literární rešerše zvolili dva geny *ASCL1* a *SLIT2*, kdy hlavní podmínkou pro výběr do naší studie byla prokázaná přítomnost metylace DNA v jejich promotorové oblasti v rámci dat z projektu TCGA data. To jsme si ověřili prohlížečem Mexpress.

**Gen *SLIT2*** (Slit Guidance Ligand 2) je nervová naváděcí molekula lokalizována na chromozomu 4p15.2 a s jejím příbuzným receptorem *ROBO1* (Roundabout) hrají zásadní roli ve vývoji nervového systému. Nicméně její funkce nejsou omezeny pouze na tento systém. Signální dráha *SLIT/ROBO* funguje také při vývoji srdce, gonád, folikulů a ledvin. Osa *SLIT-ROBO* hraje důležitou roli v normální biologii kmenových buněk s možnými dopady na vznik rakovinných kmenových buněk [102]. Četné studie prokázaly sníženou expresi genu *SLIT2* u široké škály nádorů, což zdůrazňuje jeho potenciál jako nádorového supresoru. Bylo však publikováno, že signalizační osa *SLIT2/ROBO1* vyvolává buď supresivní nebo stimulační účinky na růst nádoru a metastázy, v závislosti na buněčném kontextu [103]. Signalizační osa *SLIT2/ROBO1* potlačuje růst nebo metastázy u karcinomu prsu na druhou stranu podporuje růst a metastázy u kolorektálního karcinomu a chemicky indukovaného spinocelulárního karcinomu. Tyto výsledky potvrzují mnohočetné účinky signální dráhy *SLIT2/ROBO1* na progresi nádoru [103]. Ve studii [99] byl analyzován stav metylace promotoru/exonu1 u *SLIT2* a *ROBO1* v karcinogenezi děložního čípku, kde byla prokázaná jejich snížená exprese v cervikálních lézích. Methylace promotoru *SLIT2* a *ROBO1* by tedy mohla odpovídat za sníženou expresi těchto genů během karcinogeneze děložního čípku. Závěr této studie vykazoval epigenetické změny v alespoň jednom z genů *SLIT2* nebo *ROBO1*, což ukazuje na jejich význam v cervikální tumorigenezi [99].

**Gen *ASCL1*** (Achaete-scute homolog 1) je lokalizován na chromozomu 12 a hraje klíčovou roli v neuronální diferenciaci. Působí jako transkripční faktor, který zpřístupňuje uzavřený chromatin a umožňuje dalším faktorům vázat se a aktivovat nervové dráhy. Přímou váže motiv E boxu (5'-CANNTG-3') na promotory a podporuje transkripci neuronových genů. Hraje roli v raných fázích vývoje specifických nervových linií ve většině oblastí CNS (centrální nervová soustava) a několika linií v PNS (periferní nervová soustava). Gen je nezbytný pro generování čichových a autonomních neuronů [104]. Mutace v tomto genu mohou ve vzácných případech přispívat k fenotypu kongenitálního centrálního hypoventilačního syndromu (CCHS) [105].

Před stanovením rozsahu metylace konkrétních genů bylo potřeba optimalizovat specifické primery k zajištění specifického průběhu PCR reakce. Gen *SLIT2* se nám bohužel nepodařilo optimalizovat, a proto byl z dalších analýz vyřazen. Nepodařená optimalizace mohla spočívat v chybném návrhu primerů a při nastavení podmínek pro PCR či ve volbě DNA polymerázy. Ve studii (106,107) s optimalizací neměli problém, zvolili odlišné primery. U genu *ASCL1* byly navrženy 2 páry specifických primerů a to pro amplikon *ASCL1\_1* a *ASCL1\_2* pokrývající promotorovou oblast a oblast exonu 1. Amplikon *ASCL1\_1* se podařilo zoptimalizovat na Master Mix Top Bio a druhý amplikon *ASCL1\_2* se podařilo zoptimalizovat na Master Mix Generi.

Pro metylační analýzu byla DNA podrobena bisulfitové konverzi pomocí EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Tento kit zvolili pro svou studii i [108]. K následnému vyhodnocení metylačního stavu promotorů genu *ASCL1* jsme použili metodu MS-HRM, která je založená na změnách teploty tání DNA v roztoku. Výhodou této metody je analýza všech CpG ostrůvků amplikonu. Další důležitý parametr pro výběr této metody byl pro nás fakt, že celá metoda se uskutečňuje v PCR zkumavce. To znamená, že analýza vzorku probíhá, ve zkumavce, ve které byl amplifikován. To nám zajistilo dostatečnou rychlost zpracování vzorků a eliminaci případné kontaminace produktu PCR, které bývají v klinických výzkumech velkým problémem.

Analýza 28 nenádorových kontrolních vzorků bez diagnózy nádorového bujení neprokázala žádný důkaz hypermetylace promotoru ani u jednoho amplikonu. Našimi výsledky se nám však podařilo prokázat u vzorků odebraných z děložního čípku s nádorovým bujením již dříve publikovanou [97,98] zvýšenou metylací u obou amplikonů *ASCL1*. Stupeň metylace byl dále klasifikován v jednotlivých úrovních: žádná (0 %), nízká (10-25 %), střední (25-50 %) a vysoká (> 50 %). V rámci víceúrovňové komplexní analýzy *ASCL1* jsme v relevantních případech provedli také srovnání našich výsledků s daty získanými z TCGA

databáze. TCGA data zahrnovala především údaje o metylačním stavu CpG ostrůvků, ale také o expresi *ASCL1* na úrovni mRNA, a také vybraná klinicko-patologická data jednotlivých nádorů. Naše výsledky odpovídaly TCGA datům.

Specifická našeho testu vyšla 1 (100 %) a senzitivita 0,76 (76 %). Nízká senzitivita je problém a bylo by potřeba rozšířit analýzu o další geny. Je důležité podotknout, že senzitivita a specifická nevyovídají o diagnostické hodnotě testu zcela vyčerpávajícím způsobem, neboť hodnotí výsledky jen z pohledu srovnání „výsledek vs skutečnost“. Avšak v klinické praxi je výsledek testu jedinou informací, kterou má diagnostikující lékař k dispozici [109].

Po statistickém vyhodnocení našich výsledků byla pozorována významná predikce invazivnosti nádoru. Výsledky naší studie naznačují, že zvýšená metylace promotoru *ASCL1\_1* a *ASCL1\_2* byla významně asociována s invazí karcinomu do lymfatické tkáně, do CK junkce, do endometria, do myometria a do parametrií a může tedy představovat indikátor potenciální invaze karcinomu do okolních tkání. Rozsah nádorového bujení v těle hodnotí tzv. staging. V naší práci jsme zjistili významnou korelaci metylace DNA u vzorků, kde se karcinom šířil mimo dělohu (stadium II) a u vzorků s prokázanou invazí do lymfatických uzlin (stadium III) [110]. Stádium karcinomu je jedním z nejdůležitějších faktorů při volbě léčby a prognóze onemocnění. Zajímavá studie [111] prokázala, že právě gen *ASCL1* řídí expresi genů spojených s epiteliálně-mezenchymální tranzicí (EMT) v buněčných liniích rakoviny hrtanu. EMT je komplexní vývojový program, který umožňuje rakovinným buňkám potlačit jejich epiteliální rysy a vede ke změně epiteliálního fenotypu buňky v mezenchymální typ. Tato změna umožňuje buňkám získat mobilitu a schopnost migrovat z primárního místa [112]. Přejít z epitelu na mezenchym hraje i důležitou roli v progresi a metastázování rakoviny děložního čípku [113]. Význam genu *ASCL1* a jeho mechanismy u karcinomu děložního čípku však stále nejsou zcela známy.

## 5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala hledáním potenciálního diagnostického a prognostického markeru pro karcinom děložního čípku založeného na analýze metylace DNA, který by se mohl vyšetřovat za použití neinvazivních metod.

Na základě literární rešerše jsme našli dva geny, a to *ASCL1* a *SLIT2*, u kterých byla v jejich promotorové oblasti prokázána metylace v projektu Atlas rakovinového genomu prohlížečem Mexpress. Oba geny byly v odborné literatuře spojovány s případy karcinomu děložního čípku.

Pro gen *ASCL1* byly navrženy dva páry primerů a pro gen *SLIT2* byl navržen jeden pár primerů. Následně byla provedena optimalizace k dosažení optimální teploty pro jejich nasedání na DNA. Potýkali jsme se s problémem při optimalizaci primerů u genu *SLIT2*, způsobeného pravděpodobně nevhodně navrženou sekvencí primerů.

Pro určení rozsahu metylace v oblasti promotoru u genu *ASCL1* byla zvolena metoda MS-HRM, která je využívána pro analýzu nekvalitní DNA izolované z parafinových bločků. Naše data ukázala statisticky významně vyšší přítomnost metylace sledované promotorové oblasti amplikonu *ASCL1\_1* a *ASCL1\_2* ( $p=0,000$ ) u vzorků karcinomu děložního čípku v porovnání s nenádorovou tkání děložního čípku.

Dále se povedlo dokázat korelaci s vysokou statistickou významností vybraných amplikonů s klinicko-patologickými charakteristikami. U amplikonu *ASCL1\_1* byla pozorována vyšší četnost metylace u histopatologického gradingu. Pro oba amplikony pak byla pozorována vyšší četnost metylace u T stádia v TNM klasifikaci a u pacientů s FIGO stádiem II a III. Pro oba amplikony bylo obzvlášť statisticky významné šíření karcinomu do okolních tkání. Převládala invaze karcinomu do lymfatických cév a šíření do CK junkce, endometria, myometria a do parametrií.

Z našich výsledků vyplívá, že význam souvislosti mezi klinicko-patologickými daty a promotorovou metylací genu *ASCL1* by se mohl v budoucnu využít, jako biomarker pro predikci invaze karcinomu děložního čípku do okolních tkání. Stanovené cíle diplomové práce považuji za splněné. Jsou však potřeba další studie na další geny.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] EVBUOMWAN, O. a Y.S. CHOWDHURY. Physiology, Cervical Dilation [online]. [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557582/>.
- [2] INFORMEDHEALTH.ORG. Cervical cancer: Overview [online] 2012, [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279259/>.
- [3] FOWLER, JR, EV MAANI a BW JACK. StatPearls [Internet]: Cervical Cancer [online]. 2017 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431093/>.
- [4] SYMPTOMY.CZ. Kontrola děložního čípku [online]. 2021 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.symptomy.cz/kontrola-delozniho-cipku>.
- [5] DENG, H., E. HILLPOT a S. MONDAL. HPV16-Immortalized Cells from Human Transformation Zone and Endocervix are More Dysplastic than Ectocervical Cells in Organotypic Culture. *Scientific Reports*: 2018, doi:10.1038/s41598-018-33865-2
- [6] EUROCYTOLOGY. Funkce hrdla [online]. 2014 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/930>.
- [7] NATIONAL CANCER INSTITUTE (US). Cervical Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version, 2022 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65985/>.
- [8] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cervical cancer. 2021 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: [https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab_1).
- [9] VENKETAS, J. a M. SINGH. Cervical cancer: a meta-analysis, therapy and future of nanomedicine. *Ecancermedicalscience*. 2020, doi:10.3332/ecancer.2020.1111.
- [10] SPAANS, Vivian M., Marjolijn D. TRIETSCH a Alexander A. W. PETERS. Precise Classification of Cervical Carcinomas Combined with Somatic Mutation Profiling Contributes to Predicting Disease Outcome. *PLOS ONE*. 10(7): 2015, doi:10.1371/journal.pone.0133670.
- [11] MANIKANDAN, S., S. BEHERA, N. NAIDU a další. Knowledge and awareness toward cervical cancer screening and prevention among the professional college female students. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*. 11(6), 2019, doi:10.4103/JPBS.JPBS\_21\_19.
- [12] NADACE PRO VÝZKUM RAKOVINY ČESKÁ REPUBLIKA. O rakovině děložního čípku [online]. 2022 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.vyzkumrakoviny.cz/o-rakovine-delozniho-cipku/>.

- [13] SCHIFFMAN, M., N. WENTZENSEN a S. WACHOLDER a další. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 103(5): 368-383, 2011, doi:10.1093/jnci/djq562.
- [14] CHAN, Ch.K., G. AIMAGAMBETOVA a T. UKYBASSOVA a další. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives. *Journal of Oncology*. 1-11, 2019, doi:10.1155/2019/3257939.
- [15] MARKMAN, M., X. W. JIN, J. CASH a A. W. KENNEDY a další. Human papillomavirus typing and the reduction of cervical cancer risk. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 66(9): 533-539, 1999, doi:10.3949/ccjm.66.9.533.
- [16] DUŠEK, L., J. MUŽÍK, D.MALÚŠKOVÁ a další. Epidemiology of Screening-targeted Cancers According to New Data of the Czech National Cancer Registry. *Klinická onkologie*. 27(2): 2S19-2S39, 2014, doi:10.14735/amko20142S19.
- [17] HALADA, P., ŠPAČEK, J. Epidemiologie, etiopatogeneze karcinomu děložního hrdla a současné možnosti jeho prevence [online]. 2011 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/epidemiologie-etiotogeneze-karcinomu-delozniho-hrdla-a-soucasne-moznosti-jeho-prevence-457919>.
- [18] MOUKOVÁ, L. Karcinom děložního čípku. *Masarykův onkologický ústav*. (17)1, 2022.
- [19] LINKOS.CZ. Zhoubné nádory děložního hrdla (čípku) [online]. 2022 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/gynekologicke-nadory-c51-54-c56-57/zhoubne-nadory-delozniho-hrdla-cipku/>.
- [20] SVOD.CZ. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [cit. 2022-5-09]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>.
- [21] AMADOR-MOLINA, A., J. HERNÁNDEZ-VALENCIA a E. LAMOYI. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. *Viruses*. 5(11): 2624-2642, 2013, doi:10.3390/v5112624.
- [22] BARTOŠÍK, M., R. HRSTKA a L. JIRÁKOVÁ. Human Papillomavirus – Role in Cervical Carcinogenesis and Methods of Detection. *Klinická Onkologie*. 2018, 31(2), doi:10.14735/amko201889.
- [23] EUROCYTOLOGY. Funkce hrdla 2014 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/930>.

- [24] EUROCYTOLOGY. Etiologie rakoviny děložního hrdla [online]. 2014 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/956>.
- [25] PETIGNAT, P. a M. ROY. Diagnosis and management of cervical cancer. *BMJ* : 765-768, 2007, doi:10.1136/bmj.39337.615197.80.
- [26] NATIONAL CANCER INSTITUTE (US). Cervical Cancer Screening (PDQ®): *PDQ Cancer Information Summaries*. 2021 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65772/>.
- [27] COMPARETTO, C. a F. BORRUTO. Cervical cancer screening: A never-ending developing program. *World Journal of Clinical Cases*. 2015, doi:10.12998/wjcc.v3.i7.614.
- [28] TSIKOURAS, P., S. ZERVOUDIS a B. MANAV. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. 320-325, 2016.
- [29] SHAKI, O., B.K. CHAKRABARTY a N NAGARAJA. A study on cervical cancer screening in asymptomatic women using Papanicolaou smear in a tertiary care hospital in an urban area of Mumbai, India. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. :7(4), 2018, doi:10.4103/jfmpe.jfmpe\_313\_17.
- [30] KITCHEN, F.L. a CH.M. COX. Papanicolaou Smear: *StatPearls* [online]. 2021.
- [31] KOLIOPOULOS, G., V.N. NYAGA a N. SANTESSO a další. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018, doi:10.1002/14651858.CD008587.pub2.
- [32] PARK, K. J., A. ROMA a N. SINGH a další. Tumor Staging of Endocervical Adenocarcinoma: Recommendations From the International Society of Gynecological Pathologists. *International Journal of Gynecological Pathology*.: 40(1)., 2021, doi:10.1097/PGP.0000000000000758.
- [33] JOLLY, S., S. UPPAL a N. BHATLA. Improving Global Outcomes in Cervical Cancer: The Time Has Come for International Federation of Gynecology and Obstetrics Staging to Formally Incorporate Advanced Imaging. *Journal of Global Oncology* [online]. 2018, (4), 1-6. Dostupné z: doi:10.1200/JGO.2016.007534.
- [34] BRIERLEY, J. The evolving TNM cancer staging system: an essential component of cancer care. *Canadian Medical Association Journal*. 174(2): 155-156, 2006, doi:10.1503/cmaj.045113.
- [35] BRIERLEY, J., M. GOSPODAROWICZ a B. O'SULIVAN. The principles of cancer staging. *Ecancermedicalscience*. 2016, doi:10.3332/ecancer.2016.ed61.

- [36] TELLONI, Stacy M. Tumor Staging and Grading: A Primer. *Methods in Molecular Biology*. 1-17, 2017, doi:10.1007/978-1-4939-6990-6\_1.
- [37] LINKOS. TNM klasifikace [online]. 2022 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/tnm-system-tnm-klasifikace/>.
- [38] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice. 2nd edition, 2014 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269603/#ch6.s10>.
- [39] THE AMERICAN CANCER SOCIETY. Cervical Cancer Stages [online]. 2022 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>.
- [40] CHOVANEC, J. a M. NÁLEŽINSKÁ. Přehled diagnostiky a léčby karcinomu děložního hrdla. *Onkologie.*: 269-274, 2014.
- [41] COOPER, D.B., J. CARUGNO a G.W. MENEFE. Conization Of Cervix: *StatPearls* [online]. 2021 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441845/>.
- [42] NGOMA, M. a P. AUTIER. Cancer prevention: cervical cancer. *Ecancermedicalscience*. 2019, doi:10.3332/ecancer.2019.952.
- [43] GÜZEL, C., J. VAN STEN-VAN'T HOFF a I.M.C.M. DE KOK. Molecular markers for cervical cancer screening. *Expert Review of Proteomics*. 18(8): 675-691, 2021, doi:10.1080/14789450.2021.1980387.
- [44] TIFFON, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(11), 2018, doi:10.3390/ijms19113425.
- [45] HAMILTON, J.P. Epigenetics: Principles and Practice. *Digestive Diseases*. 29(2): 130-135, 2011, doi:10.1159/000323874.
- [46] MOOSAVI, A. a A.M. ARDEKANI. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. 20(5), 246-258, 2016, doi:10.22045/ibj.2016.01.
- [47] BARTOŠÍK, M. a E. ONDROUŠKOVÁ. Novel Approaches in DNA Methylation Studies – MS-HRM Analysis and Electrochemistry. *Klinická onkologie*. 29(4): 4S64-4S71, 2016, doi:10.14735/amko20164S64.
- [48] WATANABE, Y. a M. MAEKAWA. Methylation of DNA in Cancer. 145-167. *Advances in Clinical Chemistry*. 145-167, 2010, doi:10.1016/S0065-2423(10)52006-7.
- [49] KULIS, M. a M. ESTELLER. DNA Methylation and Cancer. Epigenetics and Cancer, Part A. *Advances in Genetics*. 27-56. 2010, doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2



- [50] PEINADO, M.A. Hypomethylation of DNA. *Encyclopedia of Cancer*. 1791-1792. 2011, doi:10.1007/978-3-642-16483-5\_2923.
- [51] JIN, B., Y. LI a K. D. ROBERTSON. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? 2(6): 607-617, 2011, doi:10.1177/1947601910393957.
- [52] LANATA, C. M, S. A CHUNG a L. A CRISWELL. DNA methylation 101: what is important to know about DNA methylation and its role in SLE risk and disease heterogeneity. 5(1): 2018, doi:10.1136/lupus-2018-000285.
- [53] HOLČÁKOVÁ, J. Effect of DNA Methylation on the Development of Cancer. *Klinická onkologie*. 31(2), 2018, doi:10.14735/amko20182S41.
- [54] SCHMITZ, R. J., Z.A. LEWIS a M.G. GOLL. DNA Methylation: Shared and Divergent Features across Eukaryotes. *Trends in Genetics*. 35(11): 818-827, 2019, doi:10.1016/j.tig.2019.07.007.
- [55] LAKSHMINARASIMHAN, R. a G. LIANG. The Role of DNA Methylation in Cancer. DNA Methyltransferases - Role and Function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 151-172, 2016, doi:10.1007/978-3-319-43624-1\_7.
- [56] SCHOLARLY COMMUNITY ENCYCLOPEDIA. Methylation [online]. 2022 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://encyclopedia.pub/entry/3607>.
- [57] JIN, B. a K. D. ROBERTSON. DNA Methyltransferases, DNA Damage Repair, and Cancer. Epigenetic Alterations in Oncogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 3-29, 2013, doi:10.1007/978-1-4419-9967-2\_1.
- [58] NEIDHART, M. DNA Methylation – Introduction. *DNA Methylation and Complex Human Disease*. 1-8, 2016, doi:10.1016/B978-0-12-420194-1.00001-4.
- [59] ZHU, H., H. ZHU a M. TIAN a další. DNA Methylation and Hydroxymethylation in Cervical Cancer: Diagnosis, Prognosis and Treatment. *Frontiers in Genetics*. 2020, doi:10.3389/fgene.2020.00347.
- [60] DAS, P. M. a R. SINGAL. DNA Methylation and Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 22(22): 4632-4642, 2004, doi:10.1200/JCO.2004.07.151.
- [61] EHRLICH, M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 1(2): 239-259, 2009, doi:10.2217/epi.09.33.
- [62] LISANTI, S., W. A. W. OMAR, B. TOMASZEWSKI a další. Comparison of Methods for Quantification of Global DNA Methylation in Human Cells and Tissues. *PLoS ONE*. 8(11), 2013 doi:10.1371/journal.pone.0079044.
- [63] EHRLICH, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 21(35): 5400-5413. 2002, doi:10.1038/sj.onc.1205651.

- [64] LOZANO-UREÑA, A., E. JIMÉNEZ-VILLALBA a A. PINEDO-SERRANO a další. Aberrations of Genomic Imprinting in Glioblastoma Formation. *Frontiers in Oncology*. 2021, doi:10.3389/fonc.2021.630482.
- [65] BAJRAMI, E. a M. SPIROSKI. Genomic Imprinting. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 4(1): 181-184. 2016, doi:10.3889/oamjms.2016.028.
- [66] ZOGHBI, H.Y. a A.L. BEAUDET. Epigenetics and Human Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 8(2), 2016, doi:10.1101/cshperspect.a019497.
- [67] KURDYUKOV, S. a M. BULLOCK. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*. 5(1). 2016, doi:10.3390/biology5010003.
- [68] BARIA. Rychlokurz epigenetiky – 2. část [online]. 2021 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/rychlokurz-epigenetiky-2-cast/>.
- [69] BRAHMACHARI, V. a S. JAIN. Methylation-sensitive Restriction Endonucleases. *Encyclopedia of Systems Biology*. 1300-1301, doi:10.1007/978-1-4419-9863-7\_852.
- [70] CHMELAŘOVÁ, M. a V. PALIČKA. Nejčastěji využívané metodiky k analýze DNA metylačních změn. *Časopis lékařů českých*. 150: 442-445, 2011.
- [71] GARCÍA-GIMÉNEZ, J.L., J. BELTRÁN-GARCÍA, C. ROMÁ-MATEO a . Epigenetic biomarkers for disease diagnosis. *Prognostic Epigenetics*. 21-44, 2019, doi:10.1016/B978-0-12-814259-2.00002-9.
- [72] NYGREN, A. O. H. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research*. 33(14), 2005, doi:10.1093/nar/gni127.
- [73] ZHAO, F. a B. BAPAT. The Role of Methylation-Specific PCR and Associated Techniques in Clinical Diagnostics. *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. 155-173, 2016, doi:10.1016/B978-0-12-801899-6.00008-5.
- [74] YANG, A. S. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research*. 32(3): 38-38, 2004, doi:10.1093/nar/gnh032.
- [75] CREATIVE BIOMART. MS-HRM Analysis Service. 2022.
- [76] AL ABOUD, N.M., C. TUPPER a I. JIALAL. Genetics, Epigenetic Mechanism. *StatPearls* [online]. 2021 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532999/>.
- [77] YUN, M., J. WU, J.L. WORKMAN a B. LI. Readers of histone modifications. *Cell Research*. 21(4): 564-578. 2011, doi:10.1038/cr.2011.42.

- [78] AUDIA, J.E. a R.M. CAMPBELL. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 8(4), 2016, doi:10.1101/cshperspect.a019521.
- [79] MOLINA-SERRANO, D., D. KYRIAKOU a A. KIRMIZIS. Histone Modifications as an Intersection Between Diet and Longevity. *Frontiers in Genetics*. 2019, doi:10.3389/fgene.2019.00192.
- [80] ALASKHAR ALHAMWE, B., R. KHALAILA aj. WOLF a další. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. 14(1). 2018, doi:10.1186/s13223-018-0259-4.
- [81] KODÍČEK, M. RNA-interference. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. 2007 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=rna-interference](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=rna-interference).
- [82] MOCELLIN, S. a M. PROVENZANO. *Journal of Translational Medicine*. 2(1), 2004, doi:10.1186/1479-5876-2-39.
- [83] BEDKOWSKA, G.E., S. ŁAWICKI a M. SZMITKOWSKI. Molecular markers of carcinogenesis in the diagnostics of cervical cancer. *Postepy Hig Med Dosw*. 99-105, 2009.
- [84] LAENGSRİ, V., U. KERDPIN a C. PLABPLUENG. Cervical Cancer Markers: Epigenetics and microRNAs. *Laboratory Medicine*. 49(2): 97-111. 2018, doi:10.1093/labmed/lmx080.
- [85] VALÍK, D., NEUKOLÁ, M., Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klin. Biochem* [online]. *Metab*, 22-39, 2014 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2014/2014-1/KBM-2014-1-Dopor-TM-22.pdf>.
- [86] WANG, L., L. HUANG a L. XI. High expression of squamous cell carcinoma antigen in poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach: A case report. *World Journal of Clinical Cases*. 8(19): 4572-4578, 2020, doi:10.12998/wjcc.v8.i19.4572.
- [87] SHUKLA, S., J. DASS a M. PUJANI. P53 and bcl2 expression in malignant and premalignant lesions of uterine cervix and their correlation with human papilloma virus 16 and 18. *South Asian Journal of Cancer*. 3(1): 048-053, 2020 doi:10.4103/2278-330X.126524.
- [88] KHALISSA, D., K. ABDELHALIM a X. XIE. Immunohistochemical Expression of p53 and Bcl-2 in Algerian Cervical Carcinoma. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 11(1): 67-75, 2018, doi:10.13005/bpj/1348.
- [89] KAILASH, U, C C SOUNDARARAJAN a R LAKSHMY. Telomerase activity as an adjunct to high-risk human papillomavirus types 16 and 18 and cytology screening in

- cervical cancer. *British Journal of Cancer*. 95(9): 1250-1257, 2006, doi:10.1038/sj.bjc.6603375.
- [90] NATIONAL CANCER INSTITUTE: The Cancer Genome Atlas Program. 2022.
- [91] KOCH, A., T. DE MEYER a J. JESCHKE. MEXPRESS: visualizing expression, DNA methylation and clinical TCGA data. *BMC Genomics*. 16(1). 2015, doi:10.1186/s12864-015-1847-z.
- [92] LABGUIDE. Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek [online]. 2019 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-dna-pomoci-gravitacnich-kolonek/>.
- [93] GARCÍA-ALEGRÍA, A.M., I. ANDURO-CORONA a C.J. PÉREZ-MARTÍNEZ. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry*. 1-9. 2020, doi:10.1155/2020/8896738.
- [94] LI L., DAHIYA R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 18(11), 1427-31, 2002.
- [95] GENERI BIOTECH [online]. 2022 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/>.
- [96] LABGUIDE. Polymerázová řetězová reakce (PCR) [online]. 2019, [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>.
- [97] CLARKE, M. A., P. LUHN, J.C. GAGE a Nicolas WENTZENSEN a další. Discovery and validation of candidate host DNA methylation markers for detection of cervical precancer and cancer. *International Journal of Cancer*. 141(4): 701-710, 2017, doi:10.1002/ijc.30781.
- [98] KREMER, W. W., M. VAN ZUMMEREN a P. W. NOVIANTI a další. Detection of hypermethylated genes as markers for cervical screening in women living with HIV. *Journal of the International AIDS Society*. 21(8), 2018, doi:10.1002/jia2.25165.
- [99] MITRA, S., D. MAZUMDER-INDRA, R. K. MONDAL a . Inactivation of SLIT2-ROBO1/2 Pathway in Premalignant Lesions of Uterine Cervix: Clinical and Prognostic Significances. *PLoS ONE*. 7(6), 2012, doi:10.1371/journal.pone.0038342.
- [100] NARAYAN, G., Ch. GOPARAJU a H. ARIAS-PULIDO a další. Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. *Molecular Cancer*. 5(1), 2006, doi:10.1186/1476-4598-5-16.

- [101] SINGH, R.K., D. INDRA a S. MITRA a další. Deletions in chromosome 4 differentially associated with the development of cervical cancer: evidence of slit2 as a candidate tumor suppressor gene. *Human Genetics*. 122(1): 71-81, 2007 doi:10.1007/s00439-007-0375-6.
- [102] WEINHÄUSER, I., D. A. PEREIRA-MARTINS, C. ORTIZ a další. Reduced SLIT2 is Associated with Increased Cell Proliferation and Arsenic Trioxide Resistance in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancers*. 12(11), 2020, doi:10.3390/cancers12113134.
- [103] YUAN, M., H. GUO, J. LI, YUAN a LI. Slit2 and Robo1 induce opposing effects on metastasis of hepatocellular carcinoma Sk-hep-1 cells. *International Journal of Oncology*. 49(1):, 305-315. 2016, doi:10.3892/ijo.2016.3506.
- [104] UNIPROT. UniProtKB – P50553 (ASCL1\_HUMAN), 2022.
- [105] GENE CARDS. ASCL1 Gene – Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1 [online]. 2022 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ASCL1>.
- [106] YU, J., Q. CAO. The neuronal repellent SLIT2 is a target for repression by EZH2 in prostate cancer. *Oncogene*. 29(39): 5370-5380, 2010 doi:10.1038/onc.2010.269.
- [107] KIM, M., J. KIM a S. BAEK. Specific expression and methylation of SLIT1, SLIT2, SLIT3, and miR-218 in gastric cancer subtypes. *International Journal of Oncology*. 48(6): 2497-2507, 2016, doi:10.3892/ijo.2016.3473.
- [108] LIU, T., Y. LI, W. DUAN a další. Cold acclimation alters DNA methylation patterns and confers tolerance to heat and increases growth rate in Brassica rapa. *Journal of Experimental Botany*. 68(5): 1213-1224, 2017, doi:10.1093/jxb/erw496.
- [109] DUŠEK, L., PAVLÍK, T., JARKOVSKÝ, J. Analýza dat v neurologii XXV. Hodnocení diagnostických testů – senzitivita a specificita. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 74(107), 97-103, 2011.
- [110] SEHNAL, B., E. KMONÍČKOVÁ a J. SLÁMA. Current FIGO Staging for Carcinoma of the Cervix Uteri and Treatment of Particular Stages. *Klinická Onkologie*. 32(3), 2019, doi:10.14735/amko2019224.
- [111] MA, H., X. DU a S. ZHANG. Achaete-scute complex homologue-1 promotes development of laryngocarcinoma via facilitating the epithelial–mesenchymal transformation. *Tumor Biology*. 39(6), 2017, doi:10.1177/1010428317705752.

- [112] SANTOS RAMOS, F., L. WONS, I. JOÃO CAVALLI a další. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: An overview. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. 4(3), 2017, doi:10.15761/ICST.1000243.
- [113] QURESHI, R., H. ARORA a M.A. RIZVI. EMT in cervical cancer: Its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Letters*. 356(2): 321-331. 2015, 10.1016/j.canlet.2014.09.021.

## 7 PŘÍLOHY

**Příloha A** - Heatmap, ve které jsou vyneseny hodnoty metylace DNA pro tumory (T) a kontrolní vzorky (KO) a amplikon ASCL1\_1 a ASCL1\_2 v závislosti na jejich procentu metylace. Stupnice začíná zelenou barvou, která představuje 0 % metylace vzorku a stoupá do červené barvy, která představuje metylaci vzorků nad 50 %.

