

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



HPV infekce a význam epigenetických modulátorů ve vývoji karcinomu cervixu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Hana Ondryášová
Studijní program:	B1406
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Koudeláková
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

Data použitá v této diplomové práci byla získána během spolupráce s Dr. Merlin Pereira na University of Birmingham a byla použita za souhlasu Dr. M. Pereira i Prof. C. Woodmana. Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Bc. Hana Ondryášová

Chtěla bych poděkovat Mgr. Vladimíře Koudelákové za odborné vedení diplomové práce, poskytnutí literatury, rad a konzultačních hodin, RNDr. Radku Trojancovi, Ph.D za poskytnutí literatury, odborných rad a připomínek k dané problematice, doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za poskytnutí pracovního zázemí. Velké poděkování patří také Bc. Daně Cahové za provedení statistických analýz a Soně Mlčochové za pomoc při práci v Laboratoři experimentální medicíny. Dále Dr. Merlin Pereira za umožnění spolupráce na jejích projektech ve School of Cancer Sciences, University of Birmingham a Prof. Cairanu Woodmenovi za odborné rady.

Rovněž bych ráda poděkovala Dr. Ianu Hampsonovi a Dr. Xiaotong T. He za poskytnutí cenných rad a pracovního zázemí v University of Manchester Gynaecological Oncology laboratories, St Mary's Hospital v Manchesteru.

I. BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora	Hana Ondryášová
Název práce	HPV infekce a význam epigenetických modulátorů ve vývoji karcinomu cervixu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta University Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Vladimíra Koudeláková
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Podrobná znalost životního cyklu lidských papillomavirů (HPV) je nezbytná pro prevenci a léčbu karcinomu cervixu. Při vývoji karcinomu cervixu dochází ke změnám exprese epigenetických regulátorů a tím ke změnám exprese onkogenů a tumorsupresorových genů. V rámci prvního projektu, byly u souboru 24 pacientek s prekancerózou a karcinomem cervixu sledovány epigenetické markery DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 a WHSC1. U všech sledovaných markerů byla pozorována zvýšená exprese jak v prekarcenózní tkáni, tak u nádorových buněk. Sledované markery se tedy účastní vývoje karcinomu cervixu již od brzkých stádií. Vyšší overexprese DNMT1 a DNMT3B byla navíc asociována s integrovanou formou HPV16, což pravděpodobně souvisí s agresivnější formou nádoru.</p> <p>Existence latentní fáze infekce HPV, sledovaná v rámci druhého projektu, byla dosud popsána pouze na zvířecích modelech. V analyzovaném souboru 59 vzorků odebraných ženám středního a vyššího věku, které neměly prokázanou aktivní HPV infekci ani neoplastické změny čípku, nebyla přítomnost latentního HPV viru potvrzena. Latentní forma genitálních HPV se pravděpodobně v lidské populaci nevyskytuje, jedná se ovšem pouze o pilotní studii, kterou je třeba ověřit na větším patientském souboru. Přítomnost latentní infekce by mohla zásadně ovlivnit prevenci, časnou diagnostiku a tím prognózu pacientek s cervikálním karcinomem.</p>

Klíčová slova	karcinom cervixu ; lidský papillomavirus; DNMT1; DNMT3A; DNMT3B; EZH2; WHSC1; IHC; PCR
Počet stran	93
Počet příloh	2
Jazyk	český

II. BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Autor's first name and surname	Hana Ondryášová
Title	HPV infection and significance of epigenetic modulators in the cervical cancer development
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine, Palacky University and Faculty Hospital Olomouc
Supervisor	Msc. Vladimíra Koudeláková
The year of presentation	2012
Abstrakt	<p>Detailed knowledge of human papillomavirus (HPV) life cycle is necessary for the prevention and treatment of HPV infection and its associated cervical cancer. During cervical cancer development, expression of epigenetic regulators is changing and resulting to oncogenes and tumor suppressor genes expression changes. In first part of diploma thesis, expression of epigenetic markers DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 and WHSC1 was investigated in set of 24 patients with premalignant and tumor tissue. Overexpression of all epigenetic markers was observed in premalignant as well as tumor tissues. Epigenetic modulators play role in tumor development from early stages. Moreover, increased DNMT1 and DNMT3B overexpression was associated with integrated form of HPV16 and could be associated with more aggressive tumor type.</p> <p>Existence of the latent stage of HPV infection, studied in the second part of diploma thesis, has been described only in animal models. Existence of latent HPV infection was not confirmed in any of 59 samples from analyzed patient set (middle aged or older women who were negative for active HPV infection and without any neoplastic changes of cervix). It can be therefore concluded that the latent form of genital HPV in the human population does not probably appear. However, this is pilot study with limited sample set and it is necessary to test a larger set of patient samples. The presence</p>

of latent infection could significantly affect the prevention, early tumor diagnosis and the prognosis of patients with cervical carcinoma.

Keywords	cervical cancer; human papillomavirus; DNMT1; DNMT3A; DNMT3B; EZH2; WHSC1; IHC; PCR
Number of pages	93
Number of appendices	2
Language	Czech

III. OBSAH

I.	BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE.....	3
II.	BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION.....	5
III.	OBSAH.....	7
IV.	CÍLE PRÁCE.....	9
V.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.	ÚVOD.....	10
2.	LIDSKÝ PAPILOMA VIRUS.....	13
2.1.	HPV genom a životní cyklus viru.....	15
2.1.1.	<i>E1 a E2 replikační proteiny.....</i>	16
2.1.2.	<i>Funkce E6 a E7 hrHPV onkoproteinů.....</i>	18
2.1.3.	<i>Funkce E4 a E5.....</i>	21
2.1.4.	<i>Kapsidové proteiny L1 a L2.....</i>	22
2.1.5.	<i>Integrace HPV DNA do genomu hostitele.....</i>	23
2.2.	HPV a imunitní systém člověka.....	25
2.2.1.	<i>Očkování proti HPV.....</i>	28
3.	KARCINOM CERVIXU.....	31
3.1.	Diagnostika a léčba karcinomu cervixu.....	35
3.2.	Rizikové faktory vzniku karcinomu cervixu a HPV infekce.....	37
3.3.	Epigenetické změny v karcinomu cervixu.....	40
3.3.1.	<i>DNA metyltransferasy.....</i>	44
3.3.1.1.	<i>DNA metylace a ovlivnění exprese HPV genů.....</i>	46
3.3.2.	<i>Polycomb proteiny.....</i>	46
3.3.3.	<i>N-lysin specifické histon metyltransferasy.....</i>	50
VI.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	52
1.	MÍRA EXPRESE EPIGENETICKÝCH MODULÁTORŮ V KARCINOMU CERVIXU.....	52
1.1.	Materiál, pomůcky a přístrojové vybavení.....	54
1.2.	Vzorky patientských tkání.....	55
1.3.	Složení roztoků.....	55
1.4.	Použité metody a pracovní postupy.....	55
1.4.1.	<i>Barvení hematoxylinem a eosinem.....</i>	55

1.4.2.	<i>Imunohistochemie</i>	56
1.4.3.	<i>Izolace DNA z parafinových řezů tkáně</i>	57
1.4.4.	<i>PCR reakce</i>	57
1.4.4.1.	<i>Použité primery</i>	58
1.4.4.2.	<i>Požité buněčné linie</i>	59
1.4.4.3.	<i>Optimalizace množství DNA použitého pro následující reakce</i>	59
1.4.4.4.	<i>HPV16 a HPV18 typizace</i>	59
1.4.4.5.	<i>Určení přítomnosti integrované či episomální formy HPV</i>	60
1.5.	Výsledky	62
1.6.	Diskuse	65
2.	VÝSKYT HPV INFEKCE V EPITELU CERVIXU ODEBRANÉHO ASYMPTOMATICKÝM ŽENÁM STŘEDNÍHO A STARŠÍHO VĚKU	68
2.1.	Materiál, pomůcky a přístrojové vybavení	70
2.2.	Vzorky patientských tkání	70
2.3.	Složení roztoků	70
2.4.	Použité metody a pracovní postupy	70
2.4.	Použité metody a pracovní postupy	70
2.4.1.	<i>Izolace DNA</i>	70
2.4.2.	<i>PCR reakce</i>	70
2.5.	Výsledky	72
2.6.	Diskuse	73
2.7.	Závěr	75
VII.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
VIII.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	87
IX.	PŘÍLOHY	94

IV. CÍLE PRÁCE

Jedním z cílů této magisterské práce bylo vypracování literární rešerše zaměřené na karcinom cervixu a lidský papillomavirus (HPV). V rámci této práce byly vyšetřeny vzorky tkáně pacientek s karcinomem cervixu. U těchto pacientek byl proveden HPV screening se zaměřením na přítomnost HPV16 a HPV18 a následné zjištění, zda se HPV genom integroval do hostitelské DNA nebo zůstal episomální. Cílem projektu bylo optimalizovat inuhochemickou detekci metyltransferas DNMT1, DNMT3A a DNMT3B, EZH2 a WHSC1 a nalezené rozdíly v expresi charakterizovat. Získané výsledky této pilotní studie by mohly být důvodem pro další studium změn exprese metyltransferas v karcinomech cervixu a možným vodítkem pro nové možnosti léčby tohoto onemocnění.

Cílem druhého projektu mé diplomové práce bylo identifikovat přítomnost latentního HPV viru ve tkáni pacientek, které podstoupily hysterektomii z jiného důvodu než přítomnosti prekancerózy či karcinomu. Latentní virus byl dosud prokázán jen na zvířecích modelech. Nepřítomnost latentního viru HPV by mohla být důvodem pro zavedení očkování proti HPV i u žen mnohem starších, než se provádí dnes.

V. TEORETICKÁ ČÁST

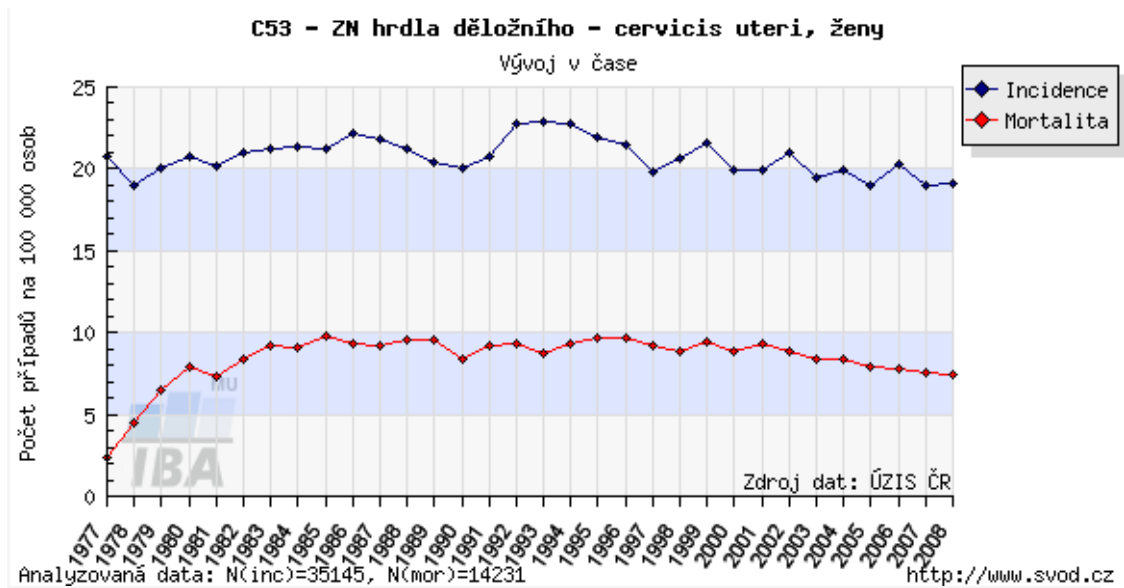
1. ÚVOD

Karcinom cervixu je relativně častým nádorovým onemocněním postihujícím ženy všech věkových kategorií (Obr. 1.). Jedná se o maligní onemocnění žen indukované pohlavně přenosnou virovou infekcí lidským papillomavirem (HPV). Většina žen se HPV nakazí krátce po začátku svého sexuálního života (Májek et al., 2012; Woodman et al., 2007). Karcinom cervixu je po karcinomu prsu nejčastějším nádorovým onemocněním u žen a více než 90 % nádorů cervixu je HPV pozitivní (de Sanjosé, 2007; Walboomers et al., 1999). Na celém světě ročně diagnostikují nádor cervixu více než 500 000 žen, přes 270 000 žen ročně na toto onemocnění umírá. Téměř 85 % všech případů tvoří pacientky z rozvojových zemí. HPV viry způsobují řadu dalších nádorových onemocnění anogenitální oblasti a také některé nádory hlavy a krku. Onkogenní HPV označujeme jako „high risk“ HPV (hrHPV), mezi ně patří typy 16 a 18, které odpovídají za více než 70 % všech cervikálních karcinomů, typy 31 a 45 za dalších 10 % (Májek et al., 2012; Woodman et al., 2007).

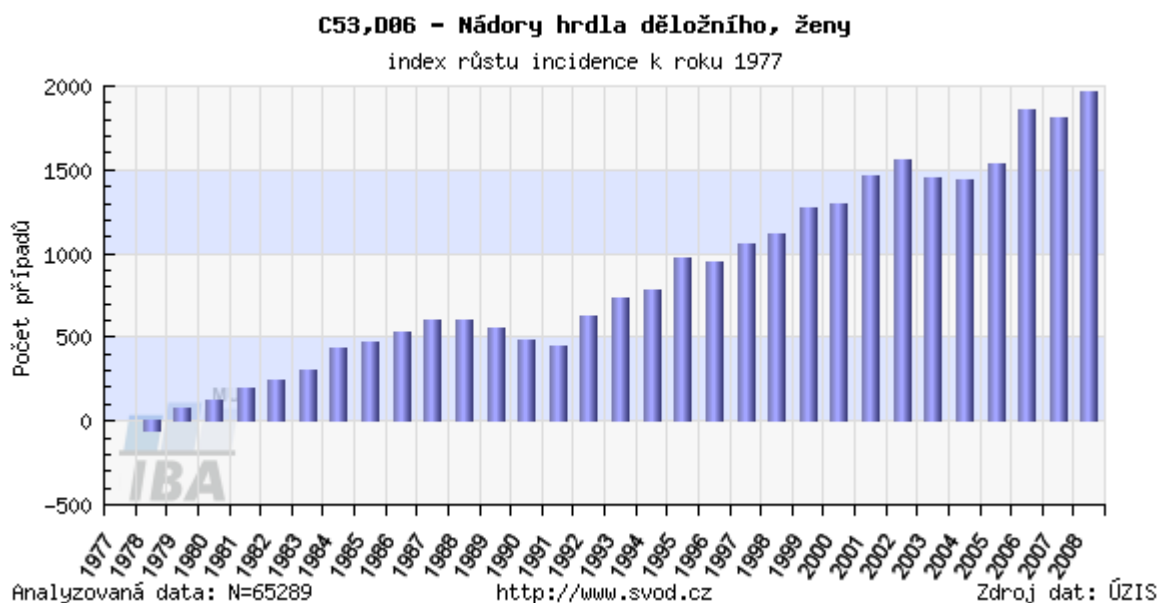
Genitální HPV infekce se vyskytují u žen i mužů všech ras a všech socioekonomických skupin. Největší výskyt HPV infekce u žen ve věku 20–25 let (prevalence až 45 %) je následován prvním nárůstem incidence karcinomu cervixu u věkové skupiny 25–29 let. Druhý vrchol prevalence HPV infekcí je v intervalu 45–50 let. Celkově 50 – 80 % sexuálně aktivních lidí je v průběhu života nakaženo HPV (Májek et al., 2012; Melkert et al., 1995), z nichž 20 až 30 % HPV- pozitivních mužů i žen je infikováno více typy HPV (Giuliano et al., 2008; Mendez et al., 2005). U mužů genitální HPV způsobuje rakovinu konečníku, penisu a pohlavní bradavice. Nejvíce mužů infikovaných hr HPV patří do věkové skupiny 30-34 let, ale už ve věku 18-19 let byla HPV infekce prokázána u téměř 20 % případů (Giuliano et al., 2008). HPV infekce je ve většině případů nezbytná, ale ne dostačující pro vznik karcinomu cervixu. Vývoj karcinomu cervixu je velice pomalý, který je podmíněný persistentní infekcí hrHPV. Primární infekce HPV je většinou asymptomatická (90 % žen) a obvykle do cca 8–12 měsíců sama odezní. U přibližně 10 % žen následně vznikají dysplastické změny v epitelu cervixu, u méně než 1 % dojde ke vzniku karcinomu *in situ* (CIS) a u méně než 0,2 % se vyvine invazivní cervikální karcinom (Májek et al., 2012; Woodman et al., 2007).

Pomalý vývoj karcinomu cervixu dává dostatečný prostor pro odhalení HPV infekce screeningem, který by musel být celoplošný a vysoce organizovaný, aby vedl ke snížení incidence a mortality (Májek et al., 2012). V České republice incidence mortality karcinomu cervixu už dlouhodobě stagnuje (Obr. 1.), ale počet pacientek s tímto onemocněním je rok od roku vyšší (Obr. 2.). Karcinomem cervixu dosahuje nejvyšší

incidence u žen ve věku 50 let, incidence prudce roste už od 20. roku žen a mortalita od 25. roku (Obr. 3.).

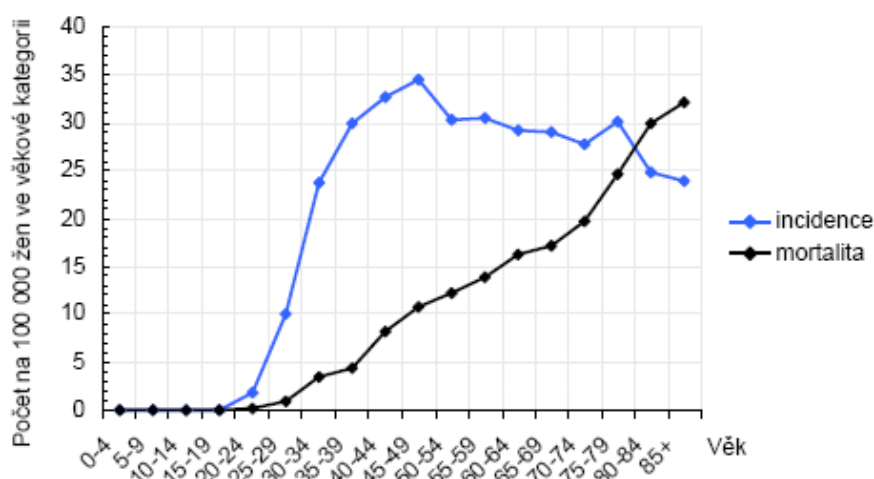


Obr. 1.: Incidence a mortalita karcinomu děložního hrdla v České republice (www.svod.cz)



Obr. 2.: Index růstu incidence nádoru děložního hrdla v České republice (www.svod.cz)

Věkově specifická incidence a mortalita

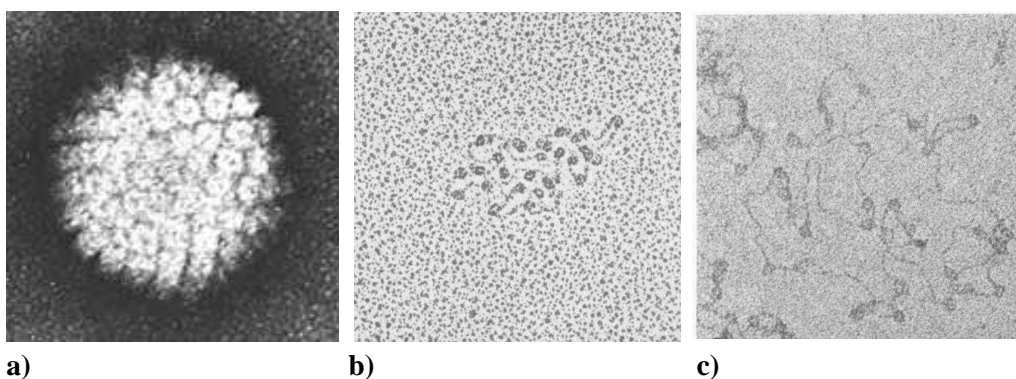


Obr. 3.: Epidemiologie karcinomu děložního hrdla v ČR – věkově specifické analýzy založená na datech Národního onkologického registru, 2001–2005 (Májek et al., 2012).

Celoplošný screening a očkování proti HPV by v budoucnu měl snížit výskyt a mortalitu karcinomu cervixu. V rámci vyšší účinnosti těchto opatření bychom se měli zaměřit i na muže a jejich ochranou proti HPV. Jedná o pohlavně přenosnou infekci, před níž by měly být chráněny ženy i muži. Oběma pohlavím tento virus způsobuje onkologická onemocnění a nepříjemné bradavice (Giuliano et al., 2008; Melkert et al., 1995; Woodman et al., 2007). Je však pravděpodobné, že ani tato ochranná opatření nepovedou k vymizení nemocí způsobených HPV. Imunizace organismu očkováním pacienta ochrání pouze před HPV, proti nimž je vakcína cílena. Ochrana vakcinací nebude absolutní a není zcela jasné, jak dlouhou dobu budou očkovaní jedinci před HPV chráněni, riziko vzniku nádoru způsobeného HPV navíc přetrvává u starších jedinců bez očkování. V genomech HPV rovněž nemůžeme vyloučit změny, které způsobí neúčinnost vakcinace (Woodman et al., 2007). Proto je i nadále výzkum vlivu HPV na vývoj karcinomů cervixu velmi důležitý.

2. LIDSKÝ PAPILOMAVIRUS

Lidské papillomaviry (HPV) patří do čeledi *Papillomaviridae*. HPV jsou neobalené viry s ikosaedrálním kapsidem o průměru 55nm (**Bernard, 2005**). Kapsid je tvořena 72 pentamery hlavního kapsidového proteinu L1 a více než 12 kopiemi minoritního kapsidového proteinu L2 (**Lowe et al., 2008**). 8kb dlouhý HPV genom tvořený cirkulární dsDNA je uspořádán do přibližně 30 nukleosomů (Obr. 4.), což umožňuje 2,5 krát zkrátit délku HPV DNA (**Favre et al., 1977**). HPV genom je přepisován pouze v jednom směru (**Bernard, 2005**).



Obr. 4.: Elektronové mikrofotografie HPV virionu (a) (**Brunell, 2007**) a nukleoproteinového komplexu HPV DNA (b,c) (**Favre et al., 1977**)

Jsou známy sekvence genomů více než 118 typů HPV, ale předpokládaný počet typů HPV se pohybuje okolo 200. Jako nový HPV typ je definován HPV virus, jehož sekvence genu pro L1 protein se liší minimálně z 10 %. 40 typů HPV infikuje genitální trakt a 15 z nich bylo klasifikováno jako kancerogenní (hrHPV). Papillomaviry dělíme do 16 rodů, nejdůležitější je rod Alfa-papillomaviry napadající sliznice a kůži. Alfa-papillomaviry zahrnují veškeré hrHPV i lrHPV (low-risk HPV, nekancerogenní) napadající genitálie (**Bernard, 2005; de Villiers et al., 2004**). Mezi hrHPV způsobující nádorová onemocnění řadíme HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82. 3 typy HPV byly klasifikovány jako pravděpodobné hrHPV (26, 53 a 66). 12 typů HPV je považováno za lrHPV(6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108), infekce těmito typy HPV může být bezpříznaková nebo může vést ke vzniku benigních lézí či bradavic (**Muñoz et al., 2003**). Nejrozšířenější jsou infekce hrHPV typy 16, 18, 45 a 31 (**Bosch et al., 1995; de Sanjosé et al., 2007**). Beta-papillomaviry způsobují benigní i maligní kožní léze u pacientů se sníženou imunitou nebo s geneticky podmíněným kožním onemocněním epidermodysplasia verruciformis (EV). Pacienti s EV mají mutaci v genu pro TMC6 nebo TMC8, kódující integrální membránové proteiny endoplasmatického retikula. Tato mutace je činí extrémně citlivými k infekci HPV5 a HPV8. Infekce HPV5 a HPV8 vede

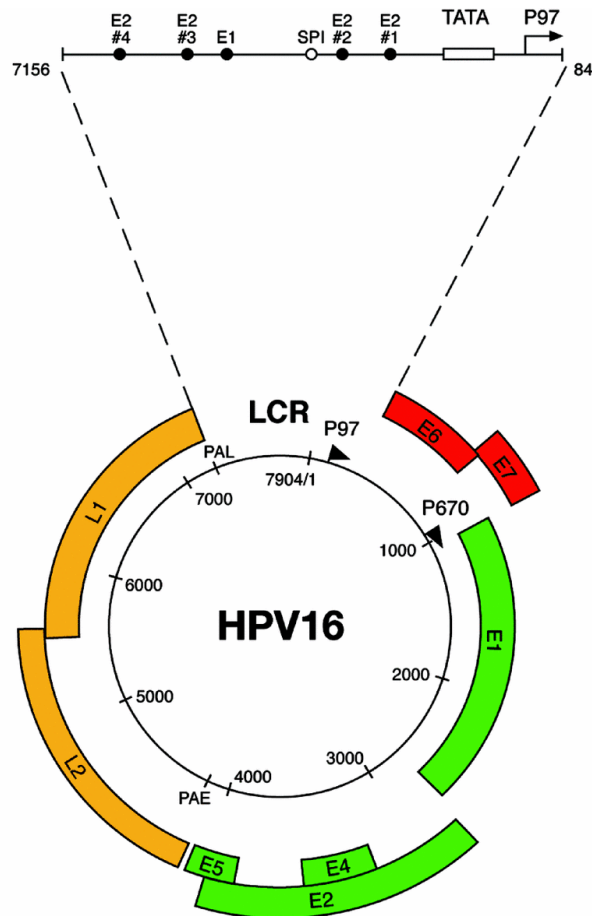
ke tvorbě maligních lézí na kůži exponované slunci (**Bernard, 2005; Doorbar, 2006; Ramoz et al., 2002**). Gama, Mu a Nu-papillomaviry způsobují benigní kožní léze (**Bernard, 2005**).

Lidský papillomavirus je druhově i tkáňově specifický. Alfa-HPV napadají výhradně mnohvrstevný dlaždicový epitel kůže a sliznic. Po poranění epitelu nebo při přímém kontaktu v oblasti přechodu dlaždicového epitelu v cylindrický (děložní hrdlo, anus, farynx) se HPV dostává do bazální vrstvy epitelu obsahující mitoticky aktivní buňky, v jejichž jádře se HPV následně replikuje. Během normálního vývoje epitelu dochází u keratinocytů v suprabazální vrstvě k zastavení buněčného cyklu, terminální diferenciaci a následné programované smrti. HPV vyvinul mechanismus pro změnu normální kontroly buněčného růstu, zachování buněčného cyklu a nastavení replikace své DNA. Jednotlivé fáze životního cyklu HPV jsou závislé na diferenciaci infikovaných keratinocytů. Replikační model HPV má 3 fáze. Po úspěšné infekci bazálních buněk epitelu nízkým počtem HPV dochází k první na buněčném cyklu keratinocytu nezávislé amplifikaci HPV na 20-100 kopií na buňku, v této fázi dochází pouze k omezené expresi HPV genů E6 a E7. V další fázi je počet kopií HPV v buňce stabilní. Keratinocyty migrují k povrchu epitelu a jsou exprimovány další HPV geny. Po vstupu infikovaného keratinocytu do zóny epitelu, kde dochází k terminální diferenciaci a zastavení buněčného cyklu keratinocytů, je exprese virových proteinů up-regulována za masivní amplifikace virové DNA na více než 1000 kopií na buňku. V této fázi probíhá syntéza proteinů kapsidy, jednotlivé komponenty viru se seskupují ve virion. Viriony se uvolňují z již odumřelých keratinocytů na povrchu epitelu. Buňky napadené HPV, koilocyty, mají zvětšené jádro (karyomegalie) s nepravidelnou jadernou membránou a hyperchromazií. Ale i tkáň bez koilocytů může být napadena HPV (**Kadaja et al., 2009; Middleton et al., 2003; Roztočil et al. 2011; Zheng et al., 2006**).

2.1. HPV genom a životní cyklus viru

HPV genom (8kb) můžeme rozdělit na 3 domény: nekódující dlouhou kontrolní oblast (LCR) a regiony s otevřenými čtecími rámci (ORF), kde jsou lokalizovány tzv. časné geny (E1, E2, E4-E7) tvořící více než polovinu HPV genomu a pozdní geny (L1 a L2) (Obr. 5.). Veškeré důležité ORF jsou lokalizované pouze na jednom DNA řetězci. Tyto tři domény jsou odděleny časným (PAE) a pozdním (PAL) polyadenylačním místem (**Schwartz et al., 1983; Stanley et al, 2007**). LCR je DNA segment o 850bp (10 % genomu), kde se nachází počátek replikace (ORI) a vazebná místa pro řadu transkripčních faktorů nezbytných pro regulaci RNA polymerasy II, která iniciuje transkripci v oblasti časných i pozdních virových promotorů (Obr. 5.) (**Zheng et al., 2006**). Transkripce HPV

proteinů probíhá z polycystronní mRNA obsahující překrývající se čtecí rámce (**Ganguly & Perihar, 2009**).



Obr. 5.: Organizace HPV genomu

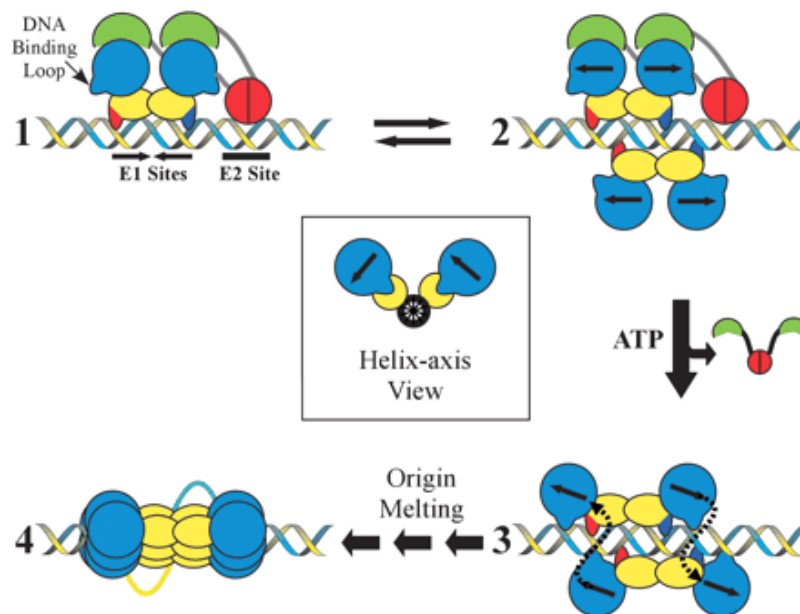
Genom HPV16 (7904 bp) je znázorněn jako černý kruh, na němž je vyznačen časný (p97) a pozdní (p670) promotor. Časné geny (E1, E2, E4-E7) jsou exprimovány z p97 nebo p670 v různých stádiích diferenciace epitelálních buněk. Pozdní ORF (L1a L2) jsou rovněž exprimovány z p670 po změně splicingu a změně polyadenylačního místa z časného (PAE) na pozdní (PAL). Všechny HPV ORF se nachází na jednom řetězci cirkulární dsDNA. Na obrázku je zvětšená oblast LCR obsahující vazebná místa pro E2, E1proteiny, SPI a TATA box promotoru p97 (**Doorbar, 2006**).

Na počátku každé HPV infekce je ve většině případů poranění epitelu, které umožní průnik virionů k bazálním buňkám, kde je kapsidový protein L1 rozpoznán buněčným receptorem (heparan sulfát peptidoglykany, např. syndekan-1) a virus je transportován do buňky. Syndekan-1 je silně up-regulovaný při hojení ran, jeho exprese je naopak nízká v migrujících a proliferujících keratinocytech. Poranění epitelu tedy zvyšuje schopnost bazálních keratinocytů vázat a internalizovat HPV. Sekundárním receptorem HPV je $\alpha 6$ integrin. $\alpha 6$ integrin se nachází se na celém povrchu buněk migrujících k místu poranění.

HPV částice navázané na $\alpha 6$ integrin během hojení jsou endocytosou přemístěny do buňky. Viriony pronikají do bazálních keratinocytů pomocí na dynaminu závislé endocytosy řízené klathrinem nebo kaveolinem. Díky nízkému pH v endosomu dochází ke konformačním změnám v kapsidu a dalších molekul viru a následnému uvolnění virové DNA nebo komplexu virové DNA s L2, která putuje do jádra keratinocyty. Další možnou cestou HPV do buňky je pomocí kaveolinových váčků, které přepraví virus do Golgiho aparátu a/nebo hladkého endoplasmatického retikula (HPV31). Endocytické dráhy jsou vzájemně propojené (Hindmarsh & Laimins, 2007; Latian & Tianyu, 2010).

2.1.1. E1 a E2 replikační proteiny

Po vstupu HPV do buňky jsou nejprve exprimovány geny pro E1 a E2 proteiny nezbytné pro replikaci HPV genomu. Během produktivní HPV infekce se HPV genom v buňce nachází ve formě stabilního episomu, což vyžaduje expresi virových replikačních proteinů. Protein E2 je nezbytný pro iniciaci replikace a segregaci vláken virální DNA. E2 dimery rozpoznávají palindromický motiv v LCR (Obr. 5.) a zabraňují nespécifické vazbě helikasové domény E1. Vazba E2 a E1 dimerů na ORI HPV genomu vede k vazbě druhého E1 dimeru. E2 se uvolní za spotřeby ATP a vzniklý E1 double hexamer rozvolňuje počátek replikace (Obr. 6.) (Abbate et al., 2004). Replikace závislá na E1 a E2, na rozdíl od replikace genomu napadené buňky, neprobíhá pouze jednou za buněčný cyklus hostitelské buňky. Re-replikace HPV není zastavena ani p53 signální drahou, protože E6 HPV protein iniciuje degradaci p53 (Kadaja et al., 2009).



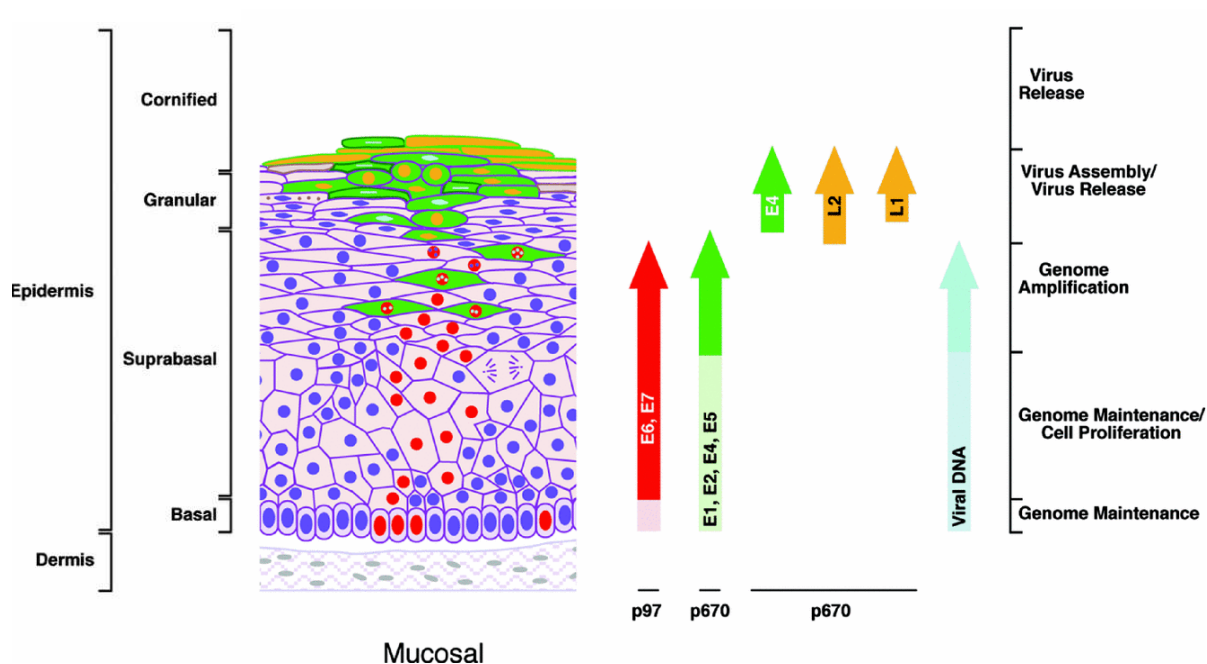
Obr. 6.: Model seskupení E1 heterodimerů na virový ORI

Aktivační doména E2 dimeru (zelená, N-konec) interaguje s E1 dimerem a DNA-vazebnou doménou (červená, C-konec), která se váže na DNA v oblasti virálního ORI. DNA-vazebná doména E1 je

znázorněna žlutě a helikasová doména modře. Po vazbě E2 a E1 dimeů na DNA nasedá na virový ORI druhý dimer E1. Kompetice aktivačních domén druhého dimeru E1 a aktivační domény E2 vede k disociaci E2 dimeru za spotřeby ATP. Nеспецифické DNA-vazebné domény E1 interagují s DNA před nebo během oligomerizace E1 dimerů. Následně se tvoří E1 double hexamer a dochází k rozvolnění dsDNA v oblasti ORI (**Abbate et al., 2004**).

HPV genom se v bazálních keratinocytech replikuje v S-fázi spolu s buněčnou DNA. Kotvení episomu E2 proteinem k mitotickým chromosomům (u některých hrHPV k mitotickému vřeténku) je nezbytné pro správnou segregaci HPV. Při integraci HPV DNA do hostitelského genomu dochází k disrupci replikačních genů HPV. Krátce po integraci vyvolávají E2 a E1 mnohonásobnou iniciaci replikace na integrovaném ORI v S-fázi buněčného cyklu. Při této replikaci dochází také k amplifikaci buněčných DNA sekvencí lokalizovaných v oblasti integrovaného HPV genomu (**Kadaja et al., 2009; Yugawa & Kiyono, 2009**).

Na diferenciaci závislá replikace HPV genomu je řízená na úrovni transkripce. V keratinocytech v suprabazální vrstvě epitelu dochází k přepnutí transkripce E1 a E2 genů z E2- řízeného časného promotoru na E2- nezávislý pozdní promotor, což vede k vysoké expresi E2 a E1 (Obr. 7.) (**Kadaja et al., 2009**). Při nízké hladině E2 je tento protein transkripčním aktivátorem, zatím co vysoká hladina E2 tlumí expresi onkogenních proteinů E6 a E7 přemístěním SP1 transkripčního aktivátoru (Obr. 5.) (**Doorbar, 2006**). Aktivační či inhibiční účinek E2 také závisí na délce E2 transkriptu, protein E2 plné délky je transkripčním aktivátorem, ale kratší forma E2 naopak represorem (**Heino et al., 2000**). Exprese E6 a E7 genů, regulovaná pomocí E2 proteinu, dovoluje malému množství infikovaných keratinocytů expandovat, zvýšit počet buněk, které budou tvořit viriony. Schopnost těchto proteinů udržovat buňky v S-fázi je nezbytná pro replikaci episomů HPV. Napadené buňky mají díky E6 a E7 deregulovaný buněčný cyklus a nedochází u nich k normální terminální diferenciaci (**Doorbar, 2006**).

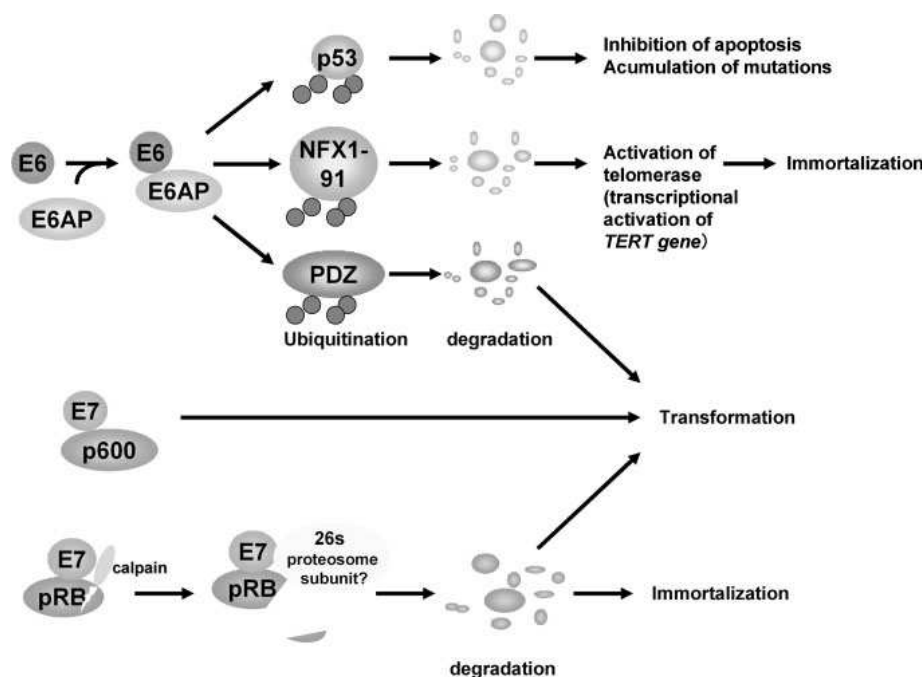


Obr. 7.: Lokalizace exprese časných a pozdních ORF HPV16 v epitelu sliznice

Keratinocyty jsou barevně rozlišeny podle toho, které HPV proteiny jsou buňkou exprimovány. Buňky s modrým jádrem jsou HPV negativní. Kmenové buňky v bazální vrstvě epitelu exprimují E1 a E2 nezbytné pro replikaci virové DNA (červené jádro). V suprabazálních buňkách s červeným jádrem dochází k expresi E6 a E7 onkogenních proteinů. Keratinocyty se zelenou cytoplasmou a červeným jádrem po aktivaci p670 exprimují ORF nezbytné pro vegetativní amplifikaci genomu (E1,E2) a E4. Je zde zachována exprese E6 a E7. Na povrchu epitelu jsou keratinocyty (žluté jádro, zelená cytoplazma) produkující L1 a L2 kapsidové proteiny a následně obsahující viriony, tyto buňky se z epitelu odlupují nebo v epitelu vznikají bradavice (**Doorbar et al., 2006**).

2.1.2. Funkce E6 a E7 hrHPV onkoproteinů

Expres E6 a E7 proteinů je během normálního životního cyklu viru, kdy se HPV genom replikuje extrachromosomálně, regulována pomocí E2. Po integraci HPV DNA do genomu hostitelské buňky dochází k nadměrné expresi E6 a E7 a stabilizaci E6 i E7 mRNA. E6 a E7 proteiny inaktivují tumorsupresory nezbytné pro správnou regulaci buněčného cyklu a apoptózy (p53 a pRB), aktivují telomerasy a způsobují immortalizaci primárních epitelálních buněk (**Gunguly & Parihar, 2009; Yugawa & Kiyono, 2009**).



Obr. 8.: Cílové proteiny hrHPV E6 a E7 onkoproteinů (Yugawa & Kiyono, 2009).

Protein E6 se společně s E6-asociovaným proteinem (E6AP) váže na p53 a iniciuje jeho degradaci v proteasomu (Obr. 8.). E6AP má funkci E3 ubiquitin ligasy a ubiquitinyluje p53, to je poté degradováno proteasomem (Gunguly & Parihar, 2009). p53 je tumorsupresorový protein, který při poškození DNA zastavuje buňku v G₁ fázi buněčného cyklu a umožňuje opravu DNA, v případě ireversibilního poškození indukuje apoptózu. Při dvoušroubovicových zlomech se aktivuje ATM kinasa, která fosforylací zvýší stabilitu p53. Aktivovaný p53 zvyšuje expresi genu pro p21^{WAF1/CIP1}, inhibitoru G₁ cyklin/CDKs a brání tak fosforylaci pRB a přechodu buňky z G₁ do S fáze (DeVita, 2008). E6 všech hrHPV obsahuje na C-konci PDZ doménu, která umožňuje vázat jiné PDZ proteiny. Mezi PDZ proteiny interagující s E6 řadíme hDLG, hScribble, MAGI-1 a MUPP-1. Buněčné proteiny s PDZ doménou jsou důležité pro zachování buněčné polariry, tvorbu adhesivních spojení mezi buňkami a vznik multiproteinových signálních komplexů. E6-řízená degradace PDZ proteinů vede ke ztrátě buněčné polariry nebo morfologické konverzi a následné buněčné transformaci a karcinogenezi (Yugawa & Kiyono, 2009). E6 také inaktivuje transkripční koaktivátor p53, adenosin deaminasu 3 (ADA3) a další transkripční koaktivátory jako CBP a p300, což vede ke snížení exprese z promotoru pro interleukin-8 (Gunguly & Parihar, 2009).

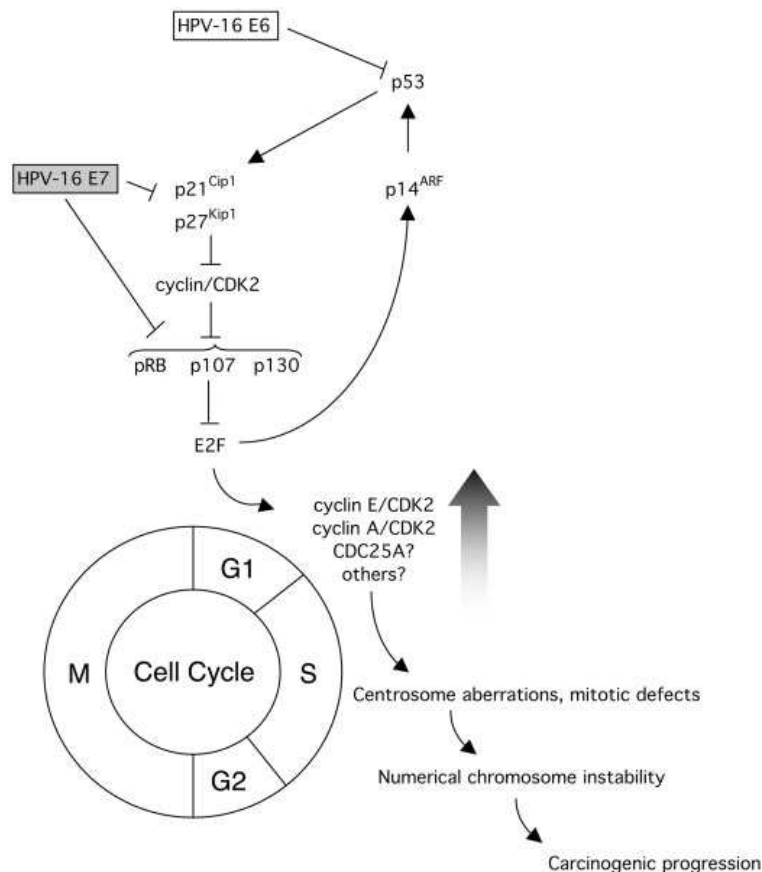
E6 aktivuje expresi telomerasy (Yugawa & Kiyono, 2009). Telomarasa (hTERT, human telomerase reverse trancriptase) je enzym zajišťující zachování délky telomer. Zachování aktivity telomerasy vede k imortalizaci nádorových buněk (DeVita et al., 2008). E6 zajišťuje degradaci NFX1-91 represoru promotoru hTERT . Po degradaci represoru

se do E-box promotoru váže heterodimer Myc/Max. S reaktivací hTERT promotoru souvisí i zvýšená exprese c-Myc indukovaná E6 (**Yugawa & Kiyono, 2009**). K imortalizaci HPV pozitivní buňky přispívá i blokáce apoptózy vazbou E6 na proapoptotické proteiny BCL-2 a Bak (**IARC, 2007**).

Během vývoje HPV infekcí indukovaného cervikálního nádoru dochází k down-regulaci Notch1 pomocí E6 a tím k potlačení diferenciaci keratinocytů a jejich abnormálnímu růstu (**Yugawa & Kiyono, 2009**). E6 interaguje také s tumorsupresorem tuberinem, který negativně reguluje signální dráhy aktivované inzulinem, a iniciuje jeho degradaci na proteasomu (**Lu et al., 2004**).

Vazba pRB na LXCXE motiv E7 onkoproteinu (N-konec) vede k ubiquitylaci pRB a následné degradaci na proteasomu. Pro E7 zprostředkovanou degradaci pRB je nezbytná vápníkem aktivovaná cysteinová proteasa kalpain. E7 váže kalpain na pRB, kalpain štěpí pRB na jeho C-konci, což vede k uvolnění E2F a proteasomální degradaci pRB (**Darnell et al, 2007**). pRB působí jako tumorsupresor v hypofosforylované formě, kdy váže E2F transkripční faktory, čímž brání vstupu buňky do S-fáze. Během normálního buněčného cyklu je pRB fosforylován komplexem cyklin D1/CDK4 a cyklin E/ CDK2. Po fosforylaci se uvolňuje E2F a buňka vstupuje do S-fáze (**DeVita et al., 2008**). K deregulaci G₁/S kontrolního bodu a následné nekontrolované proliferaci přispívá také deaktivace CDK inhibitorů (p21, p27) proteinem E7. E7 protein interaguje s řadou dalších proteinů např. p600, p107 a p130 a proteiny TNF- α a IFN- γ , což ovlivňuje regulaci apoptózy a imunitní odpovědi na HPV infekci (**Munger et al., 2001**).

E6 i E7 proteiny indukují genomickou nestabilitu hostitelské buňky (Obr. 9.). Při overexpresi těchto genů dochází ke vzniku aneuploidie, numerickým a strukturním chromosomálním aberacím. K numerickým aberacím dochází především vlivem E7 indukované dysregulace cyklinu A a E/CDK2 komplexů, která vede k chromosomální overduplikaci a tvorbě multipolárního mitotického vřeténka. Mezi strukturní aberace hromadící se v E6/ E7 exprimujících buňkách patří anafázní most. Anafázní most se tvoří mezi nechráněnými konci chromosomů, které vznikají díky častým DNA zlomům. K DNA zlomům dochází kvůli inaktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu a deregulaci proteinů nezbytných pro opravu poškozené DNA. Nepřesnou opravou zlomů dochází ke strukturním změnám chromosomů (translokacím, amplifikacím nebo delecím) (**Duensing & Münger, 2004; Yugawa & Kiyono, 2009**).



Obr. 9.: HPV16 E6 a E7 indukovaná genomická instabilita hostitelské buňky

E6 a E7 narušují signální dráhu negativně regulující růst hostitelské buňky. E7 iniciuje degradaci pRB, p107 a p130. To vede k aberantní transkripci E2F-regulovaných genů a aktivaci cyklin/CDK2 komplexů a zvýšení hladiny CDC25A. Deregulace CDK2 aktivity způsobuje abnormální chromosomální duplikaci- špatnou segregaci chromosomů, aneuploidii a kancerogenezi. E6 indukuje proteasomální degradaci p53, to ještě zvyšuje podíl buněk s mitotickými vadami (**Duensing & Münger, 2004**).

2.1.3. Funkce E4 a E5

Amplifikaci HPV genomu ovlivňují i E5 a E1^{E4} proteiny, k jejich expresi dochází ke konci životního cyklu viru. E5 je transmembránový protein lokalizovaný na endoplasmatickém retikulu, Golgiho aparátu, endosomech a buněčné membráně. E5 asociuje s protonovou vakuolární pumpou (v-ATPasa) a tím zpomaluje proces endosomální acidifikace. V endosomu dochází k recyklaci receptorů růstových faktorů (např. EGFR). Selhání endosomální acidifikace vede ke snížení degradace EGFR a zvýšení recyklace receptoru. Při overexpressi EGFR s ním E5 tvoří komplex a tím ho aktivuje. V obou případech dochází k indukci mitogenního signálu a zachování vhodných podmínek pro replikaci i ve vyšších vrstvách epitelu (**Doorbar et al., 2006; IARC, 2007; Zhang et al., 2002**).

Funkce E4 (E1^{E4}) není zcela jasná. Jeho hladina je vysoká během vegetativní amplifikace genomu viru, před začátkem syntézy L1 se ale ztrácí. E1^{E4} asociuje s komplexem cyklin B1/CDK2, translokuje komplex do cytoplasmy, kde se s ním váže na keratinová filamenta a dojde tak zastavení buněčného cyklu v G₂ fázi. E1^{E4} je tedy antagonistou E7, který stimuluje buněčnou proliferaci. E1^{E4} HPV16 je v nižších vrstvách epitelu lokalizován na filamentech (asociuje s keratinem) i volně v cytoplasmě, ale ve více diferenciovaných buňkách asociuje se solitárními perinukleárními strukturami. V E1^{E4} exprimujících buňkách nejsou detekovatelné diferenciační markery keratinocytů (**Davy et al., 2005; Doorbar et al., 1997**).

Bicistronní transkript E1^{E4} se uplatňuje při narušení mikrofilamentární struktury buňky tvořené keratinem. E1^{E4} se akumuluje ve vyšších vrstvách napadeného epitelu, kde N-koncem váže keratin a následně interaguje C-koncovou multimerizační doménou s dalšími E1^{E4} proteiny, což vede k cross-link spojů sítě intermediálních filament. Tato dynamická filamentární síť zajišťuje integritu buněk i tkáně, je nezbytná pro správný průběh mitózy, apoptózy nebo buněčného stresu. Reakcí na tyto podněty je fosforylace keratinu, fosforylovaný keratin je rozpustný. Keratin je defosforylován p38 MAPK a JNK, tvoří se nová keratinová filamenta. Fosforylace keratinu je v E1^{E4} exprimujících buňkách zvýšená v důsledku reakce na buněčný stres. V E1^{E4} exprimujících buňkách dochází k hromadění fosforylovaného a následně ubiquitinylovaného keratinu určeného k proteasomální degradaci. Exprese E1^{E4} proteinu vede k masivní degradaci keratinu, zvýšení křehkosti buněk na povrchu epitelu a usnadnění uvolnění virionů z odumřelých keratinocytů (**McIntosh et al., 2010**).

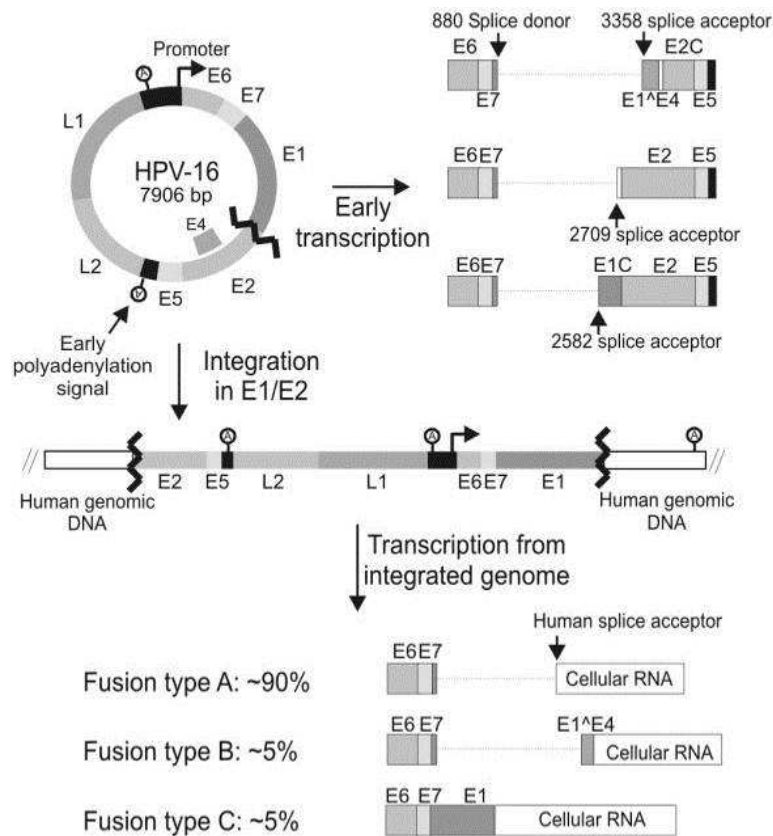
2.1.4. Kapsidové proteiny L1 a L2

Poslední fází životního cyklu HPV je syntéza kapsidových proteinů L1 a L2 a obalení zreplikovaného viru do kapsidy za vzniku virionu (Obr. 4.a). Změny, které vedou od vegetativní amplifikace genomu k syntéze proteinů kapsidy, nejsou zcela jasné, ale závisí na změně sestřihu mRNA a na vzniku transkriptu končícího na pozdní polyadenylační sekvenci. Načasování syntézy L1 a L2 je regulováno na úrovni mRNA a syntézy proteinů. V kódujících oblastech a v pozdní nekódující oblasti se nachází negativní regulační elementy. Je-li v proliferující buňce v oblasti L1 genu splicing silencer, dojde v ní k upřednostnění syntézy časných genů. Syntéza L1 i L2 je regulována dostupností tRNA pro neobvyklé kodóny v jejich mRNA, proto k jejich syntéze dochází až ve vrchní vrstvě epitelu (**Doorbar, 2006; Zheng & Baker, 2006**). L1 je sekvenčně vysoce konzervovaný, srovnání jeho sekvencí se používá pro odlišení jednotlivých HPV typů (**de Villiers et al., 2004**).

Funkcí L1 a L2 je vytvořit kapsid okolo HPV genomu. HPV kapsid se skládá z 360 kopií L1 proteinu uspořádaných do 72 pentamerů tvořících ikosahedrální strukturu kapsidu. V kapsidu se nachází 12 a více monomerů L2 proteinu, který interaguje s centrální dutinou L1 pentameru i s HPV dsDNA. L1 má schopnost samovolně se seskupit v tzv. viru podobnou částici (VLP). Interakce L1-L2 je hydrofobní. Některé domény L2 se mohou nacházet na povrchu virionu a tím ovlivnit rozpoznání HPV imunitním systémem nebo receptorem bazálních buněk (**Lowe et al., 2008**). L2 se může vázat přímo na DNA nebo s ní interagovat za účasti E2 dimerů a PML částic. Po seskupení L1 kapsomer v cytoplasmě interaguje L2 vázané na HPV dsDNA s centrální dutinou kapsomery. Kapsid stabilizují bisulfidické můstky mezi jednotlivými kapsomery (**Doorbar, 2006**).

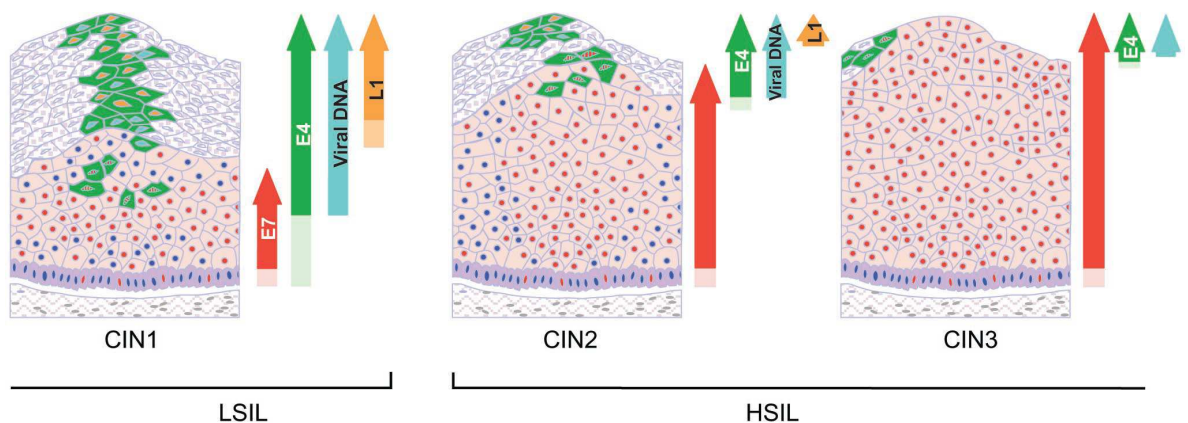
2.1.5. Integrace HPV DNA do genomu hostitele

Integrace HPV genomu do hostitelské DNA je jeden z dějů stojících na počátku nádorové progresi. Integrované hrHPV nejčastěji najdeme v CIN3 a nádorech cervixu. V některých případech obsahuje CIN3 a CIS integrované i episomální HPV. V CIN1 a CIN2 se HPV běžně vyskytuje v episomální formě. Přibližně v 50 % HPV16, resp. v 90 % HPV18 pozitivních CIN3 a CIS se nachází pouze integrovaná forma HPV (**Hudelist et al., 2003**). Do hostitelské buňky může být vložena pouze jedna kopie linearizované HPV DNA nebo konkatemizované genomy HPV (**Jeon et al., 1995**). Ke zlomu cirkulární dsDNA dochází nejčastěji v oblasti ORF E1/E2 a E4 (Obr. 10.). E2 a E4 jsou HPV proteiny, které negativně ovlivňují proliferaci a mohou způsobit zastavení buněčného cyklu v G₂ fázi. Po fragmentaci E2, negativního transkripčního regulátoru E6 a E7, dochází k upregulaci E6 a E7 (Obr. 11.). Ke zvýšení hladiny E6 a E7 přispívá také zvýšená stabilita mRNA transkriptů těchto genů. Při integraci dochází k disrupci 3' konce UTR (untranslated region), jehož transkript obsahuje element snižující stabilitu E6/E7 mRNA. Vysoká hladina E6 a E7 má za následek deregulaci buněčného cyklu, nekontrolovatelnou proliferaci a maligní transformaci hostitelských buněk (**Doorbar, 2006; Jeon & Lambert, 1995; Jeon et al., 1995; Vinther et al., 2005**).



Obr. 10.: Změna transkriptu časných genů po integraci HPV16 do hostitelského genomu

V horní části obrázku jsou znázorněny možné transkripty časných genů během infekce, kdy je HPV episomální. K integraci dochází v oblasti E1/E2 a vzniká chimérická mRNA kódující E6 a E7. Transkripce je iniciována na časném virovém promotoru (p97). Chimerická mRNA z 90 % obsahuje jen transkript E6 a E7, v 5 % je přepisován i E1 nebo E1^E4 (Vinther et al., 2005).



Obr. 11.: Změna exprese HPV proteinů během vývoje nádoru (Middleton et al., 2003)

Jednotlivé buňky jsou barevně rozlišeny podle exprese HPV proteinů. Buňky s tmavě modrým jádrem jsou neinfikované, buňky s červeným jádrem exprimují E7, se zelenou cytoplasmou exprimují E4, v buňkách s tyrkysovým jádrem dochází k vegetativní amplifikaci HPV genomu a keratinocyty s oranžovým jádrem exprimují hlavní strukturální protein kapsidu L1. Během vývoje prekarcinóz dochází ke změně formy HPV genomu. V CIN1 a CIN2 obsahují buňky episomální HPV, ale v CIN3

a nádorech převládá integrovaná forma genomu. Při integraci dochází k disrupci E2 ORF a tím deregulaci exprese E6 a E7 onkoproteinů v CIN3 a invazivním nádoru. V karcinomu dochází k pouze k expresi E6 a E7 (Middleton et al., 2003; Woodman et al., 2007).

Během integrace nedochází pouze k remodelaci HPV genomu, ale i oblastí okolo místa, kam se HPV DNA integruje. Ve většině případů se HPV integruje do tzv. oblasti častých zlomů (common fragile site, CFS) a dochází k velkým strukturním změnám, delecím, translokacím a amplifikaci genů, což jsou jevy často pozorované v nádorových buňkách. Delece v této oblasti dosahují stovek kilobásí až 9Mb. Integraci napomáhá i zvýšení genomové instability vlivem HPV infekce (viz 2.1.2.). Integrace HPV genomu není náhodná. Nejběžnějším CFS, kam se HPV integruje (48 % HPV16 a 68 % HPV18), je *FRA3B* (3p14.2), oblast genu pro tumorsupresor FHIT. Dalším častým místem integrace (25 % HPV18) je oblast genu pro protoonkogen *c-myc* (8q24.2) lokalizovaná v blízkosti dvou CFS *FRA8C* (8q24.1) a *FRA8D* (8q24.3). Geny, do nichž se HPV genom integruje nebo které se nachází v blízkosti místa integrace, mohou přispívat k vývoji nádoru cervixu. HPV se také integruje do oblasti promotoru pro hTERT, v jehož blízkosti se ale žádné CFS nenachází (Yu et al., 2005).

2.2. HPV a imunitní systém člověka

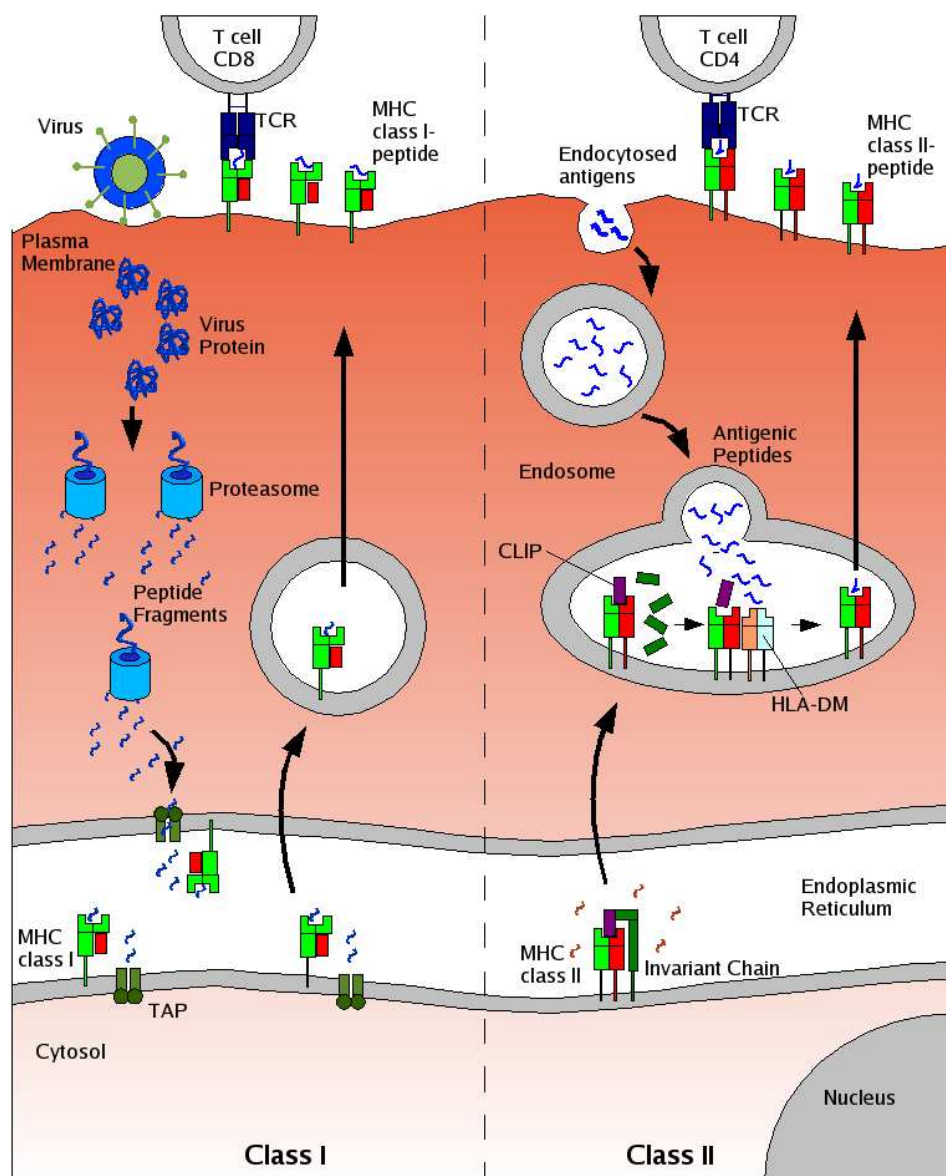
Většina HPV infekcí je v důsledku přirozené imunitní reakce pouze přechodná. Během 7-24 měsíců tělo HPV vyloučí. Proto, aby došlo k maligní transformaci, je nutná perzistentní infekce, která je definovaná jako infekce detekovaná více než jedenkrát v časovém úseku 6 a více měsíců. Interval mezi infekcí HPV a vznikem nádorového onemocnění bývá delší než 10 let (Roztočil et al., 2011). HPV se za běžných okolností nešíří organismem krví, což je jeden z důvodů proč je jen velmi malé množství HPV infikované tkáně vystavené imunitní odpovědi. Téměř neviditelnost HPV infekce pro imunitní systém napadeného organismu umožňuje HPV persistentní chronickou infekci (Stanley et al., 2007).

Replikační cyklus HPV trvá poměrně dlouho. Od infekce do uvolnění virionu uběhnou přibližně 3 týdny. Viriony se šíří z již mrtvých keratinocytů, nedochází k lýze buňky, nekróze ani k zánětu. Během infekce se do okolního prostředí uvolňuje jen velmi málo prozánětlivých cytokinů nezbytných pro aktivaci a migraci dendritických buněk. HPV by měl být v epitelu rozpoznán Langerhansovými buňkami (LB), profesionálními antigenprezentujícími buňkami dlaždicového epitelu. Vstup HPV kapsidu do LB však vyvolává specifickou imunitní odpověď. Po vazbě L1 na glykosaminoglykany lokalizované na vnější straně plasmatické membrány pomocí TLR (Toll-like receptoru) rozpoznávají HPV LB, které aktivují HPV-specifické T-lymfocyty (Le Bon & Tough, 2002; Stanley et al., 2007).

HPV se aktivně vyhýbá imunitní odpovědi hostitele hned několika způsoby. Inhibují tvorbu a funkci interferonů a expresi jimi regulovaných genů, expresi E-kadherinu v keratinocytech a interferují s MHC (Major histocompatibility complex) (**Doorbar, 2006**).

E6 a E7 hrHPV mají schopnost inhibovat imunitní odpověď down-regulací genů regulovaných interferony, které mají antivirotické a imunomodulační účinky. E6 inhibuje svou vazbou transkripční funkci regulačního faktoru interferonu 3 (IRF-3) a E7 interaguje s IRF-1 a tlumí tak jeho transkripční aktivitu pro promotor IFN- β . E6 a E7 také blokují antivirotickou a antiproliferativní funkci IFN- α (**Yugawa & Kiyono, 2009**). S HPV infekcí je také spojen úbytek Langerhansových buněk v napadeném epitelu. Adheze mezi keratinocyty a LB, nezbytná pro zachování LB v epitelu, je zprostředkována E-kadherinem. Množství E-kadherinu na povrchu HPV pozitivních buněk je vlivem E6 nízké, tím je omezena adheze keratinocyt-LB a následně buněčná imunitní reakce (**Matthews et al., 2003**).

HPV moduluje funkčnost MHC, u člověka komplex HLA (human leukocyte antigen). Expresí MHC třídy II keratinocytům umožňuje prezentovat přítomný patogen CD4+ T-lymfocytům a stimulovat tvorbu specifických protilátek B-lymfocyty (Obr. 12.). Antigeny MHC třídy II jsou syntetizovány v ER, kde se na α a β podjednotku heterodimerního MHC třídy II váže chaperon zvaný invariantní řetězec (Ii). V endosomu je Ii na trimernu $\alpha\beta Ii$ štěpen proteasami. Poté se na $\alpha\beta$ dimer MHC třídy II váže antigení peptid, MHC II poté putuje do plasmatické membrány keratinocytu a prezentuje ho T-lymfocytům. Postupná proteolytická degradace Ii je závislá na kyselém prostředí endocytotického váčku a je kritická pro správné navázání antigenu na MHC třídy II. E5 hrHPV inhibuje acidifikaci pozdního endosomu (viz 2.1.3.), což ovlivňuje vazbu antigenního peptidu (**Zhang et al., 2003**). HPV16 a 18 ovlivňuje funkčnost i MHC třídy I. snížením transkripce E7 HPV16 a 18 snižuje expresi genů pro peptidový transportér 1(TAP1) a těžký řetězec MHC třídy I TAP1 je nezbytný pro transport antigenního peptidu do ER a pro jeho následné vystavení na MHC třídy I (Obr. 12.). E5 zadržuje MHC komplex třídy I v membráně Golgiho aparátu a brání tak jeho transportu na povrch buňky (**IARC, 2007**).

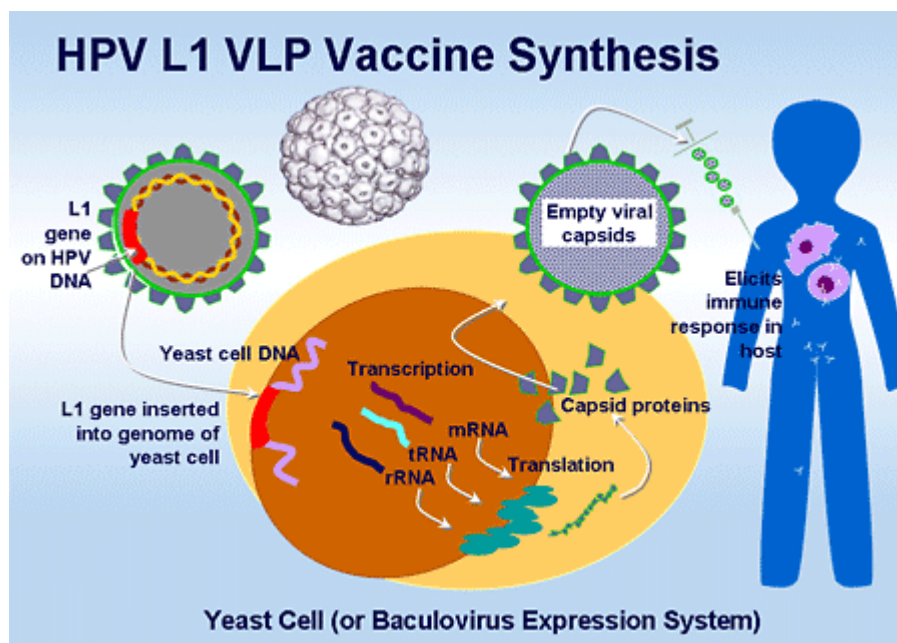


Obr. 12.: Zpracování antigenů antigenprezentujícími buňkami (www.lesc.ic.ac.uk)

Po zpracování antigenů následuje prezentace fragmentovaných proteinů (peptidů) na MHC molekulách na povrchu antigenprezentujících buněk, kde jsou rozpoznány T-lymfocyty. Peptidy vázané na MHC I jsou produkty proteasomálního štěpení antigenních proteinů. Vzniklé peptidy s hydrofobním C-koncem jsou pomocí TAP1 transportovány do ER, kde se vážou na MHC I. MHC I aktivují CD8+ T-lymfocyty (cytotoxické T-lymfocyty). Cytotoxické T-lymfocyty zabíjí virem infikované buňky ještě před ukončením replikace viru. MHC II po degradaci Ii a uvolnění poslední proteinasy váží antigenní peptid, který je do buňky transportován endocytózou. MHC II jsou rozpoznávány TCR CD4+ T-lymfocytů (pomocné T-lymfocyty). Pomocné T-lymfocyty aktivují makrofágy a B-lymfocyty (www.lesc.ic.ac.uk; Janeway et al., 2001).

2.2.1. Očkování proti HPV

Vakcína proti HPV je historicky první protinádorové očkování. Tato vakcína je pouze profylaktická, nemá žádné léčebné účinky a neovlivní ani aktivní HPV infekci. Proto je nevhodnější podávat vakcínu jedincům před začátkem jejich sexuálního života. Existují dva typy vakcín proti HPV, bivalentní a kvadrivalentní. Bivalentní vakcína Cervarix vyvinutá firmou GlaxoSmithKline chrání před HPV16 a 18. Tato vakcína bývá podávána ženám a dívkám ve věku 9 až 26 let. Cervarix je určen k prevenci premaligních genitálních lézí. Kvadrivalentní vakcína Gardasil (u nás Silgard) vyvinutá firmou Merck chrání před HPV6, 11, 16 a 18, doporučuje se ji aplikovat ženám a dívkám od 10 do 25 let. Silgard chrání navíc i před bradavicemi zevního genitálu. Účinnost vakcín dosahuje až 100 %. U očkovacích látek Silgard a Cervarix byla prokázána tzv. cross-protektce proti HPV31, 33, 45, 52 a 58. Účinnost proti nevakcinárním typům HPV bývá nižší než proti HPV, proti nimž je vakcína cílena. Oba typy vakcín obsahují L1 protein schopným seskupovat se ve VLP (virus-like particles). Vakcíny jsou připravovány za využití rekombinantních DNA technologií, kapsidové proteiny produkují kvasinky (Silgard) či bakulovirový expresní systém (Cervarix) (Obr. 13.). VLP jsou pouze prázdným HPV kapsidem bez virové DNA, který nemůže vyvolat HPV infekci, ale stimuluje tvorbu neutralizujících protilátek B-lymfocyty (DeVita et al., 2008; Sheinfeld Gorin et al., 2011; Smetana et al., 2011).



Obr. 13.: Příprava HPV vakcíny (Partridge, www.medscape.org)

Do kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) nebo bakulovirového expresního systému (buněčná linie odvozená od *Trichoplusia ni*) je vnesen gen pro L1 kapsidový protein. L1 se seskupuje v prázdný HPV kapsid, který po aplikaci člověku vyvolává silnou imunitní odpověď (Sheinfeld Gorin et al., 2011).

U obou vakcín byla prokázána velká protekční schopnost. Hladina sérových protilátek je po 7,3 letech od aplikace vakcíny Cervarix 11krát vyšší než po přirozené infekci, zato u vakcíny Silgard je hladina protilátek po 18 měsících od aplikace srovnatelná s jejich hladinou po HPV infekci. Vakcína Cervarix také indukuje vznik vyššího počtu paměťových B-lymfocytů daných antigenů než Silgard. Prokazatelně vyšší účinnost mají vakcíny aplikované dívkám před začátkem jejich sexuálního života, neoptimálnější věk pro vakcinaci se pohybuje od 11 do 14 let (**Sheinfeld Gorin et al., 2011; Smetana et al., 2011**). Očkování je velmi přínosné i pro již sexuálně aktivní ženy, riziko nové HPV nákazy přetrvává celý život. Účinnost vakcíny je u sexuálně aktivních žen stejná, ale snižuje ji perzistentní infekce získaná před ukončením očkování. I pro HPV pozitivní ženy či žen, které již HPV infekci prodělaly, může být vakcína přínosná. Většina HPV infekcí je pouze přechodná a vede ke tvorbě velmi malého množství protektivních protilátek, bez očkování je tedy možný vznik premaligních lézí v důsledku reinfekce stejným typem HPV (**Adams, 2009**).

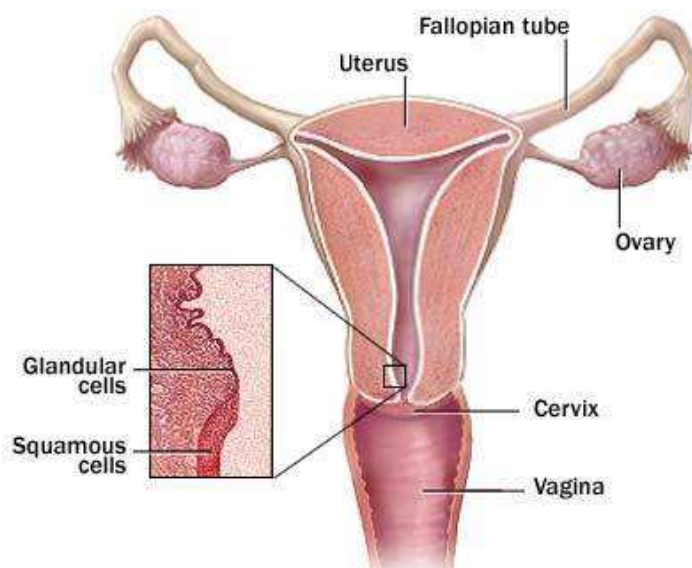
HPV vakcinace, zahájená v České republice v roce 2006, patří do kategorie doporučovaných očkování hrazených očkovaným. Během prvních 4 let se nechalo očkovat přibližně 140 tisíc dívek a žen starších 9 let. Celková proočkovanost žen a dívek ve věku 9 až 26 let je přibližně 12%. Preferovanější vakcínou je v České republice kvadrivalentní vakcína Silgard, dala jí přednost přibližně 70 % očkovaných žen. V loňském roce byl schválen zákon č. 369/2011 Sb. ze dne 6. listopadu 2011, který mění č. 48/1997 Sb., o veřejném zdravotním pojištění a změně a doplnění, podle něhož by na náklady pojišťovny měly být očkovány nejekonomičtější dostupnou vakcínou všechny dívky ve věku 13 let. Bivalentní vakcína by tedy měla být těmto dívkám plně hrazena, na kvadrivalentní vakcínu se bude doplácet. Ostatní věkové skupiny si i nadále budou muset vakcínu plně hradit (**Petráš, 2011a; Petráš a., 2011b; Petráš, 2012**). Přesná doba protekce vakcínami není známa, proto jsou nezbytné dlouhodobé studie, jejichž výsledky stanoví potřebnost přeočkování. Dalším často diskutovaným tématem HPV vakcinace je nutnost zavedení vakcinace mužů. Doporučeným věkem vakcinace mužů a chlapců je, stejně jako u dívek, 9 až 26 let (**DeVita et al., 2008; Sheinfeld Gorin et al., 2011; Smetana et al., 2011**).

Zavedení vakcinace mužů není důležité jen pro jejich vlastní ochranu, ale také pro ochranu jejich sexuálních partnerů. HPV vakcinace chrání před vznikem karcinomu cervixu a genitálních bradavic, ale i karcinomu hlavy a krku a karcinomu konečníku, jímž bývají nejčastěji postiženi homosexuální muži, ještě rizikovější je skupina HIV pozitivních homosexuálních mužů. Proočkování obou pohlaví ve věku 12 let bivalentní vakcínou by mělo za následek snížení výskytu karcinomu cervixu způsobeného HPV16 a 18 o 98,8 % Efektivnost vakcinace by byla mnohem vyšší při proočkování obou pohlaví, ve věku 12 let,

s rostoucím věkem očkovaných efektivnost vakcinace klesá (**Tiara et al., 2004; Kim, 2010**). Mezi značné nevýhody HPV vakcín patří jejich vysoká cena (Cervarix stojí přibližně 8200Kč a Silgard přibližně 10000 Kč za tři dávky vakcíny) a nízká tepelná stabilita, což snižuje možnost využití těchto očkovacích látek v rozvojových zemích, kdy je výskyt HPV infekce a karcinomu cervixu nejvyšší (**DeVita et al., 2008; Sheinfeld Gorin et al., 2011**).

3. KARCINOM CERVIXU

Karcinom cervixu je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním žen. Vzniku nádoru předchází perzistentní HPV infekce a vznik prekarcinóz. Premaligní a maligní změny nejčastěji vznikají v oblasti přechodu dlaždicového epitelu v žlázový (cylindrický), tzv. junkční zóna (Obr. 14.). Mezi prekancerózní změny řadíme dysplazii cervixu a karcinom *in situ* (CIS), označované jako cervikální interepiteliální neoplazie (CIN) (Roztočil et al., 2011).



Obr. 14.: Anatomie ženského reprodukčního systému, zvětšení v oblasti přechodu dlaždicového epitelu v žlázový (www.mayoclinic.com).

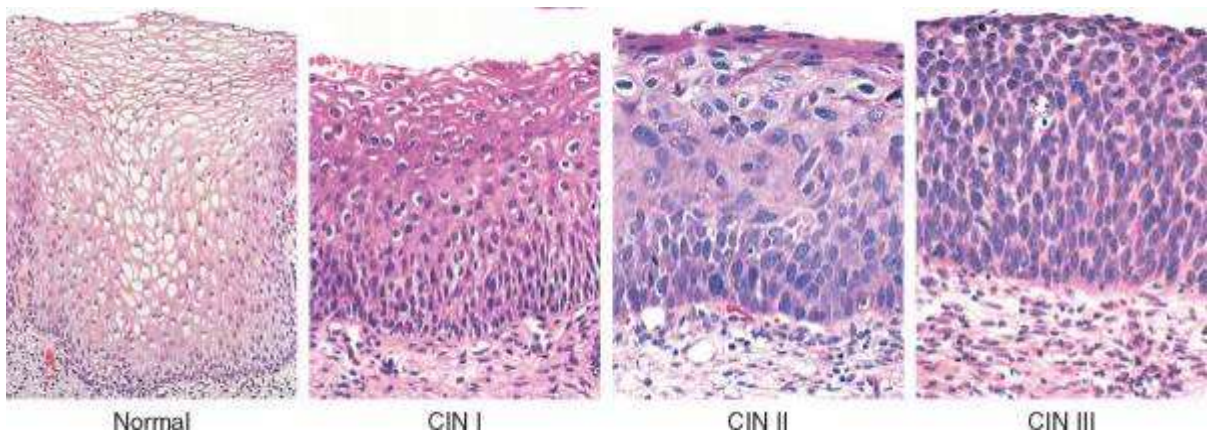
Cervikální intraepiteliální neoplazie je charakterizována změnami ve vrstvení epitelu i cytologickými změnami, jako jsou anizokaryóza, hyperchromazie, jaderná polyploidie, aneuploidie a zvýšený počet mitóz. Rozlišujeme 3 stupně dysplazií (Obr. 11. a Obr. 15.), lehkou, střední a těžkou (Roztočil et al., 2011).

Lehká dysplazie (CIN1) je charakterizována dysplastickými buňkami ve spodní třetině dlaždicového epitelu a HPV změnami z horní části epitelu (Obr 15.). CIN1 může být způsobeno lrHPV i hrHPV, nejčastěji však bývá HPV16 pozitivní. CIN1 je běžný u reprodukčně aktivních žen. Pouze malé procento CIN1 přechází v invazivní formu nádoru. Histologická klasifikace CIN1 odpovídá cytologické klasifikaci LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion), definovaným 3-6-krát zvětšeným jádrem buněk dlaždicového epitelu na úkor cytoplasmy (Obr. 16.). LSIL bývá spojen s produktivní HPV infekcí, přítomností koilocytů, ale nedochází k změně buněčného cyklu hostitelské buňky.

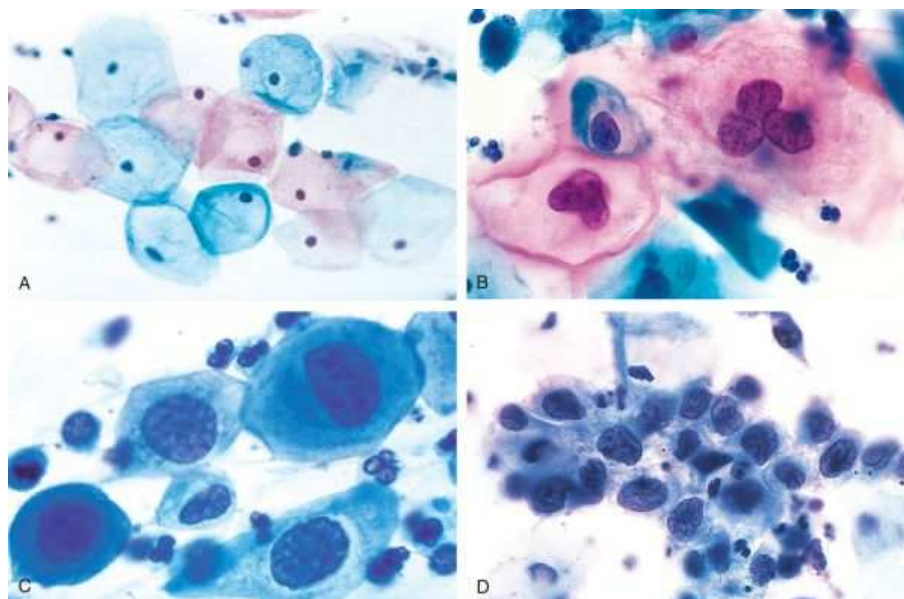
Při střední dysplazii (CIN2) se dysplastické buňky nachází ve dvou třetinách spodní části epitelu (Obr. 15.). Horní polovina epitelu stále vykazuje jistou míru maturace

a diferenciaci. Jaderné atypie na povrchu epitelu jsou výraznější než u CIN1. U pacientek s CIN2 už je indikována léčba.

U CIN3, těžké dysplazie, se nachází dysplastické buňky v celé šířce epitelu, zrání epitelu a HPV změny mohou být patrné na povrchu epitelu (Obr. 15.). Mitoticky aktivní buňky najdeme ve všech vrstvách epitelu, jsou časté i abnormální mitózy. CIN2 a CIN3 jsou považovány za skutečné prekuzory nádoru cervixu. Mitoticky aktivní dysplastické buňky, vykazují genetickou instabilitu, často bývají aneuploidní a dochází ke ztrátám heterozygosity některých genů. CIN2 a CIN3 jsou nejčastěji HPV16, 18, 31, 33 a 58 pozitivní. Histologie CIN2 a CIN3 odpovídá cytologickému obrazu HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion), charakterizovaným mnohonásobným zvětšením jádra na úkor cytoplasmy, variabilitou, hyperchromazií, granulací, degenerací jader a rozpadem jader (karyorexí) (Obr. 16.). V HSIL dochází k progresivní deregulaci buněčného cyklu HPV, což vede ke zvýšené buněčné proliferaci, snížení nebo zastavení diferenciaci keratinocytů a nižší míře virové replikace. Asi 10 % HSIL přechází v karcinom (**Roztočil et al., 2011; Wei, 2009**).



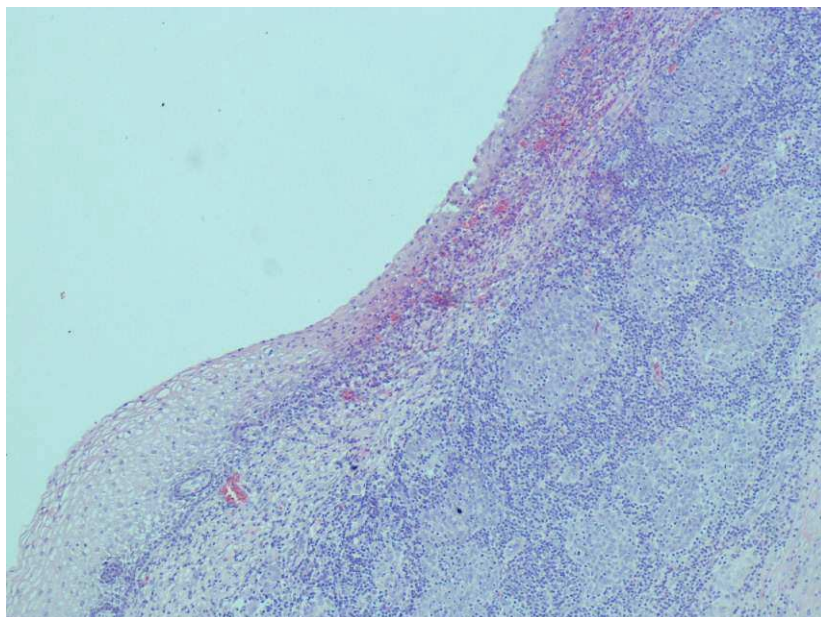
Obr. 15.: Cervikální interepiteliální neoplazie (barvení H-E)
(akramania.byethost11.com)



Obr. 16.: Cytologické změny cervikální interepitheliální neoplasie (zvětšení jádra nu úkor cytoplasmy)

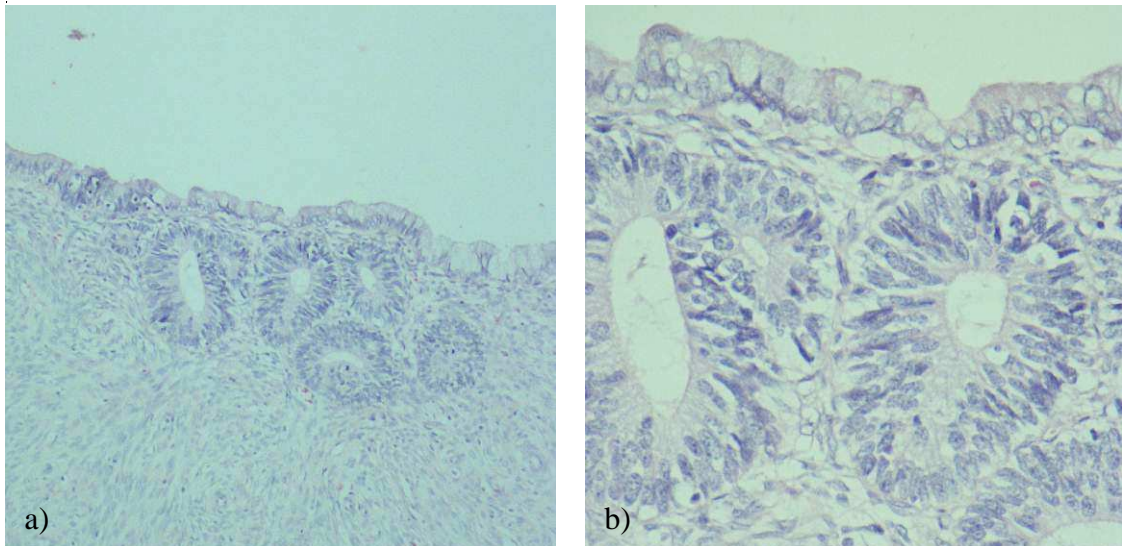
A-Normální exfoliované buňky superficiální vrstvy epitelu cervixu; B- LSIL, koilocyty; C- HSIL (CIN2) D- HSIL (CIN3) (akramania.byethost11.com).

Cytologický obraz invazivního karcinomu dlaždicového epitelu cervixu (Obr. 17.) je shodný se změnami jádra a jaderné membrány jako u HSIL, ale přidávají se změny na buněčném pozadí. Mezi buňkami je značné množství nekrotického materiálu, leukocyty a erytrocyty. Nádorové buňky mají nejasnou hranici cytoplasmy a tvoří shluky, klastry. Invazivní nádor vzniká prolomením bazální vrstvy buněk epitelu a průnikem nádorových buněk do stromatu cervixu. U karcinomu cervixu je posuzována diferenciacie nádoru jako tzv. grading. Nádory diferenciované jsou tvořeny buňkami, které se nejvíce podobají buňkám tkáně vzniku nádoru. S rostoucím gradingem se charakteristické rysy buněk původní tkáně ztrácí. Invazivní nádorový karcinom může být rohovatějící (keratinizující) nebo nerohovatějící (velkobuněčný nebo malobuněčný). Karcinomu dlaždicového epitelu cervixu tvoří 80 až 90 % karcinomů cervixu, zbylých 10 až 20 % tvoří adenokarcinomy (DeVita et al., 2008; Roztočil et al., 2011; Wei, 2009).



Obr. 17.: Velkobuněčný nekeratinizující karcinom dlaždicového epitelu cervixu (barvení H-E)

Prekarcenózní změny můžeme najít také v žláзовém epitelu vystýlajícím především endocervix. Charakteristické rysy abnormalit endocervikálního epitelu jsou: ztráta polarity jader, polymorfie buněk, ztráta soudržnosti buněk a tvorba klastrů. Premaligní změny žláзовého epitelu, atypické žláзовé buňky, přechází v adenokarcinom *in situ* a následně karcinom endocervixu. U 20 až 50 % případů adenokarcinomu (Obr. 18.) najdeme současně CIN. Adenokarcinom bývá často multifokální a tvoří smíšené nádory s karcinomem dlaždicového epitelu, tzv. adenosquamous karcinom. Pro buňky adenokarcinomu je typická tvorba velkých shluků buněk, změny stratifikace, vznik pseudožláзовých struktur (rozety), změna tvaru a okrajů buněčných shluků, chromatin na periferii jádra a časté mitózy (**DeVita et al., 2008; Roztočil et al., 2011; Wei, 2009**).



Obr. 18.: Adenokarcinom *in situ* (a) tvořený vysokými sloupcovými buňkami s jadernou stratifikací, hyperchromatií a nepravidelností (b) (barvení H-E).

Ke vzniku a růstu karcinomu děložního hrdla dochází na povrchu děložního čípku (exocervikální forma) nebo v cervikálním kanále (endocervikální forma). Časně exocervikální karcinomy tvoří květákovité nádorové útvary pronikající do pochvy, při kontaktu silně krvácejí. Endocervikální forma roste dlouho bez příznaků s invazivním charakterem růstu. Růst nádoru je obvykle kontinuální, šíří se do parametria (závěsný aparát dělohy), vaginálního epitelu, myometria hrdla a těla děložního, lymfatických uzlin a okolních orgánů (**Roztočil et al., 2011**).

Mezi symptomy karcinomu děložního hrdla patří vodnatý až krvavý výtok, nepravidelná menstruace, kontaktní krvácení (po pohlavním styku), bolesti v podbřišku a urologické komplikace jako hematurie, dysurie a hydronefróza. Počáteční fáze onemocnění nemá příliš nápadné projevy, na terapii nereagující výtok či špinění po pohlavním styku. Výraznější symptomy přichází až v pokročilejších stádiích nemoci (**Adam et al., 2004**).

3.1. Diagnostika a léčba karcinomu cervixu

Kvalitním a efektivním screeningem lze zachytit onemocnění cervixu již ve stádiu premaligních změn. Rozhodující význam v diagnostice má cytologické vyšetření, testování HPV a expertní kolposkopické či kolpofotografické vyšetření. Pro cytologické vyšetření se pacientkám provádí stěr z děložního čípku a hrdla. Cílem cytologického vyšetření je odhalit buňky maligního či premaligního charakteru. Pro hodnocení cytologického nátěru se užívá systém Bethesda 2001 (LSIL a HSIL) (Obr. 14.), uvádějící morfológickou a celkovou charakteristiku nátěru. V případě pozitivního cytologického vyšetření a/nebo makroskopického nálezu je ženám indikována kolposkopie, pro zjištění závažnosti

cervikální léze, plošného rozsahu a vztahu mezi lézí a endocervikálním kanálem. V dnešní době se užívá tzv. digitální cervikografie s okamžitým vyhodnocením kvality snímku, jeho uložením a možným zasláním školenému specialistovi. Může být také provedena rozšířená kolposkopie po aplikaci 3-5% kyseliny octové, Lugolova roztoku nebo za užití zeleného filtru, který pomáhá lépe odlišit cévní atypie. Aplikaci kyseliny octové zbledlá oblast s nahromaděním buněk se zvětšenými jádry, v normálním cervixu by se měla zbarvit pouze junkční zóny. Lugolův roztok barví normální epitel dohněda. Metoda je založena na barevné reakci glykogenu s jodem. Cervix se střední a těžkou dysplasií či nádorem produkuje malé množství glykogenu, proto se tyto oblasti nezbarví. Po pozitivní kolposkopii bývá indikována biopsie děložního čípku, nezbytná pro posouzení intraepiteliálních změn. Jedná se o histologické vyšetření hodnotící změny v maturaci dlaždicového epitelu cervixu, grading (Obr. 15.). U jednotlivých vzorků může být proveden test na přítomnost hrHPV, ta se testuje pomocí metod detekujících virovou DNA (*in situ* hybridizace, PCR) nebo pomocí sérologie, imunohistochemie a morfologických metod. HPV testování je zaměřeno na věkovou skupinu nad 35 let. Navrhovaná doba intervalu mezi vyšetřeními jsou 2 roky. Pokud jsou testy negativní a cytologie normální, měly by se zopakovat po 3-5 letech, jsou-li pozitivní po 6-12 měsících. (**Kolařík et al., 2008; Kolářová & Dörr, 2005; Roztočil et al., 2011**).

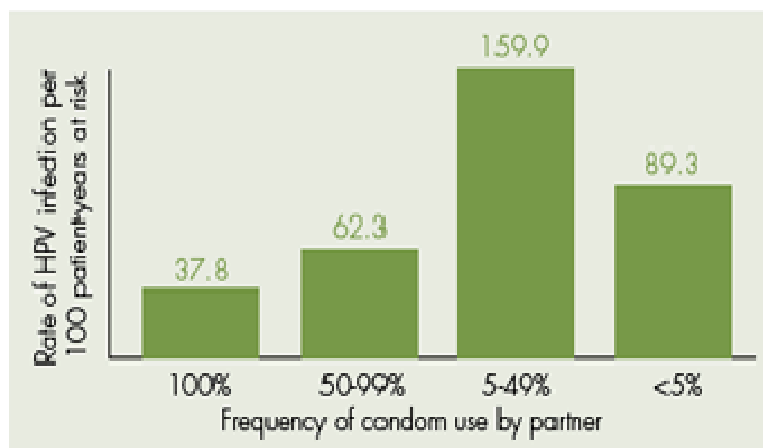
Na základě pozitivitu vyšetření je pacientům indikována terapie. U CIN2 a CIN3 popř. CIS bývá doporučen chirurgický zákrok, ablace děložního čípku. Při léčbě karcinomu cervixu se uplatňují 3 typy léčby aplikované samostatně či v kombinaci, operační léčba, radioterapie a chemoterapie. Operační léčba je indikována pacientkám v celkově dobrém stavu s časným stádiem nádoru cervixu. Tento způsob léčby umožňuje mladším ženám zachování funkce vaječníků a plodnost. V případě objemnějších nádorů bývá doporučována radikální hysterektomie s případnou pánevní lymfadenektomií. Vyoperováním léze lze zjistit přesné informace o rozsahu onemocnění (**Adam et al, 2004; Kolařík et al., 2008; Roztočil et al., 2011**).

Radioterapie bývá aplikována u pacientek v pokročilých stádiích nádoru, u pacientek, které k operaci nedaly souhlas, nebo ji u nich nebylo možné provést. Kombinací radioterapie s chirurgickou léčbou se zvyšuje riziko komplikací a vedlejších účinků léčby, bývá doporučována pacientkám s objemnými tumory, lymfo nebo angioinvasí. Radioterapii dělíme na zevní ozáření (teleradioterapii) a brachyradioterapii. Cílem zevního ozáření malé pánve je zničení nádorových buněk v oblasti parametrií a spádovém lymfatickém systému. Zevní ozáření zasahuje i ledviny, játra, stěvní klíčky, močovod a stěnu močového měchýře. Tyto orgány snesou bez poškození jen určitou dávku ozáření, proto bývá teleradioterapie kombinována s brachyradioterapií. Brachyradioterapii je druh radioterapie, při níž je zdroj záření v úzkém kontaktu s ozařovaným nádorem.

Brachyradioterapie je aplikována pomocí automatických afterloadingových systémů zaváděných do dělohy a poševních kleneb za krátkodobé celkové anestezie. Nejčastěji se užívá tzv. LDR (low-dose rate) s izotopem cesia ¹³⁷Cs (Adam et al, 2004; DeVita et al., 2008; Kolařík et al., 2008; Roztočil et al., 2011). Radioterapie bývá rovněž kombinována s chemoterapií. K léčbě karcinomu cervixu se užívají cytostatika bleomycin, ifosfamid, cisplatina, karboxyplatina, 5-fluorouracil, metotrexát, vincristin a další. K léčbě pouze chemoterapií se užívá cisplatina v monoterapii nebo v kombinaci s topotekanem (DeVita et al., 2008).

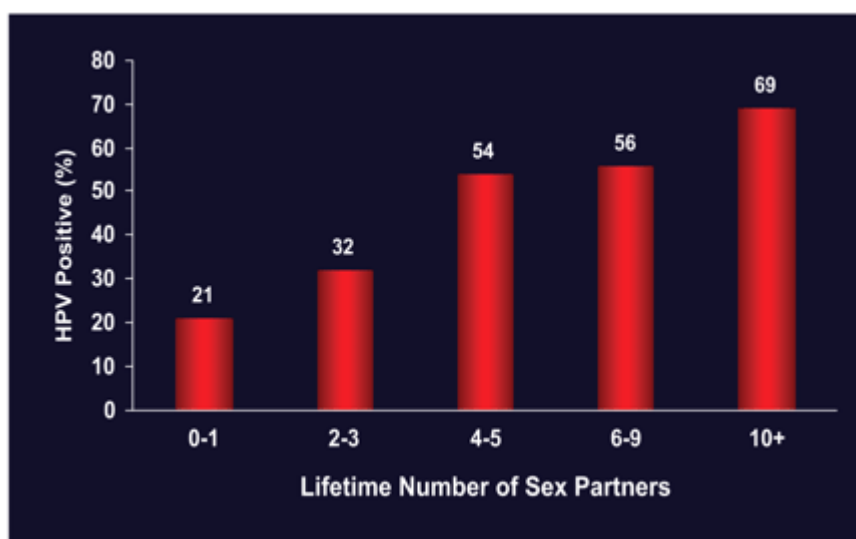
3.2. Rizikové faktory vzniku karcinomu cervixu a HPV infekce

K rizikovým faktorům vzniku karcinomu cervixu patří kouření, poruchy imunity a pohlavně přenosné infekce (HPV, HIV a *Chlamydia trachomatis*) (Adam et al, 2004). Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je infekce hrHPV, která je nezbytná, ale ne dostačující pro vznik karcinomu cervixu. Přes 90 % karcinomů cervixu je HPV pozitivních (Walboomers et al., 1999). Mezi rizikové faktory infekce HPV patří časný začátek sexuálního života (před 16. rokem), vysoký počet sexuálních partnerů, vysoký počet porodů a potratů (opakovaná lacerace děložního čípku), první porod ve velmi nízkém věku, chronické zánětlivé onemocnění postihující cervix, užívání drog, kouření (20 a více cigaret denně) a špatné socioekonomické podmínky (Adam et al, 2004; Deacon et al., 2000). hrHPV se přenáší převážně pohlavním stykem, proto je většina rizikových faktorů HPV infekce i výskyt cervikálního karcinomu spjata právě se sexuálním chováním. hrHPV se přenáší kontaktem kůže-kůže. Používání kondomů kompletně neeliminuje riziko přenosu HPV infekce (Obr. 19.). HPV infikuje i oblasti kondomem nechráněné. Užívání kondomů však chrání proti přenosu jiných pohlavně přenosných infekcí, jejichž přítomnost prokazatelně zvyšuje riziko HPV infekce a vzniku karcinomu cervixu (Verteramo et al., 2009; Weaver, 2006). Nákaza HPV a tedy i riziko karcinomu cervixu roste s každým novým sexuálním partnerem, čím vyšší je počet sexuálních partnerů, tím vyšší je riziko nákazy HPV infekcí (Obr. 20.) (Deacon et al., 2000; Weaver, 2006).



Obr. 19.: Efektivnost používání kondomu v prevenci přenosu HPV (www.arhp.org)

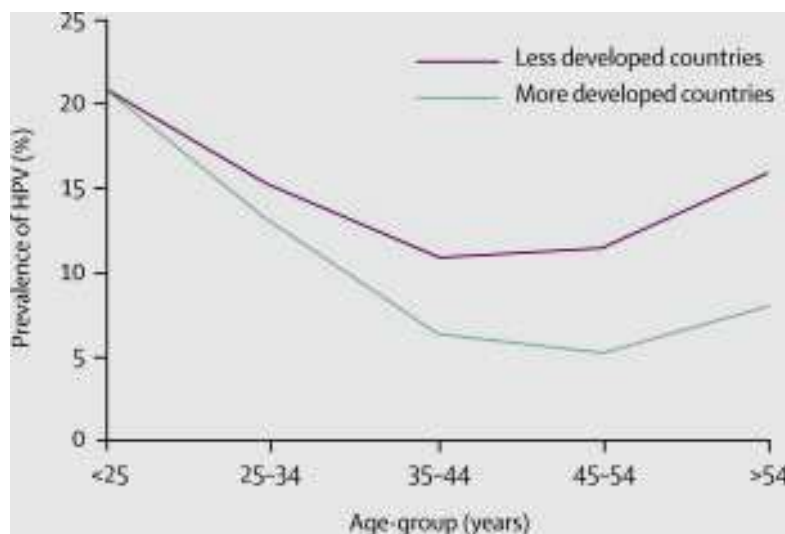
Používání kondomů snižuje riziko přenosu HPV infekce, ale ochrana není absolutní.



Obr. 20.: Nárůst výskytu HPV infekce u mladých žen s rostoucím počtem sexuálních partnerů (Weaver, 2006).

Výskyt karcinomů cervixu je nápadně nižší ve státech s již dlouhou dobu fungujícím screeningovým programem nebo ve státech, kde je sexuální život striktně regulován vírou (muslimské země), než v rozvojových zemích (DeVita et al., 2008). Dostupnost screeningových programů v rozvinutých zemích se odráží v nižší HPV pozitivitě starších žen (Obr. 21.). Zvýšení prevalence HPV infekce u starších žen může být vysvětleno několika způsoby. Hormonální změny v menopauze mohou indukovat snížení imunitní odpovědi na již existující (možná latentní) infekci HPV, který se replikuje jen v nízkém počtu. Dalším možným vysvětlením je změna sexuálního chování žen ve středním věku nebo jejich partnerů. Přes 95 % žen účastnících se HPV výzkumu v Latinské Americe potvrdilo, že jejich manžel měl mimomanželský poměr. S věkem se měnící HPV prevalence

může odrážet populačně specifickou periodu, efekt kohort. Efekt kohort by vysvětloval rozdílnou lokalizaci druhého píku HPV infekce (viz. Úvod) v populacích a odlišnost v různých oblastech světa. Na přenos HPV mají vliv sociální změny a s nimi spojená odlišnost sexuálního chování (de Sanjosé et al, 2007). Nárůst výskytu adenokarcinomu cervixu byl spojován se zavedením dlouhodobého užívání hormonální antikoncepce, ale spojitost nebyla prokázána (DeVita et al., 2008; Deacon et al., 2000). V Africe patří k dalším významným rizikovým faktorům manželství se starším mužem či s mužem majícím více manželek, raný věk prvního manželství a život ve špatných hygienických podmínkách. Vysoká prevalence HPV může být částečně způsobena HIV koinfekcí (de Sanjosé et al, 2007).



Obr. 21.: Světový odhad na věku závislé HPV prevalence ve více a méně rozvinutých zemích (de Sanjosé et al, 2007).

HIV infekce postihující CD4+ T-lymfocyty způsobuje imunodeficienci, tím umožňuje aktivaci bezpříznakové HPV infekce a zvyšuje citlivost organismu k nové HPV infekci. Imunodeficienci snižuje pravděpodobnost, že dojde k odstranění HPV imunitním systémem, vzniká perzistentní hrHPV infekce vedoucí ke vzniku nádoru cervixu u žen a nádoru konečníku u mužů. Riziko vzniku nádoru konečníku u homosexuálních mužů je dvakrát vyšší než riziko vzniku karcinomu cervixu u žen. U HIV pozitivních jedinců je možné snížit riziko přenosu HPV infekce sexuální zdrženlivostí a používáním kondomu (Strickler et al., 2005; Weaver, 2006). Zvýšené riziko nové HPV nákazy bylo pozorováno u již HPV pozitivních jedinců. U HPV18 pozitivních jedinců je minimálně 11 až 18krát větší pravděpodobnost infekce HPV 31, 39 a 45 než u HPV18 negativních osob. U HPV16 nebo 18 pozitivních pacientů je pravděpodobnost nové HPV58 nákazy 5 až 7 krát vyšší než u HPV16,18 negativních jedinců (Mendez et al., 2005). Je prokázána i role

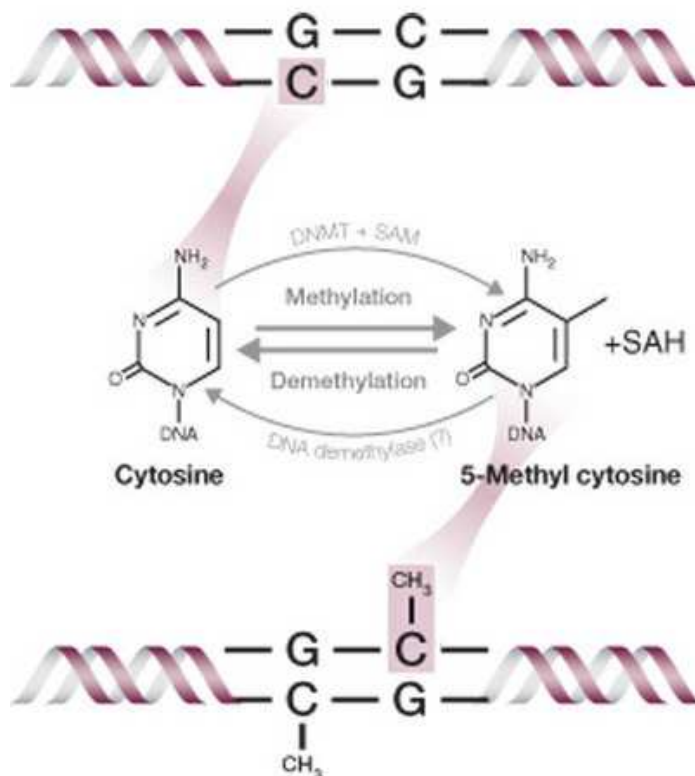
dalších pohlavně přenosných infekcí coby rizikových faktorů vzniku karcinomu cervixu. Infekce *Chlamydia trachomatis* prokazatelně zvyšuje náchylnost k HPV infekci. *C. trachomatis* způsobuje mikroabraze a změny epitelálních buněk, tím umožňuje vstup HPV virionů do cervikálního epitelu. Koinfekce *C. trachomatis* snižuje schopnost hostitelského organismu vyrovnat se s HPV infekcí. Chronická infekce vede ke zvýšené produkci volných radikálů a snížení hostitelské buněčné imunity (nezbytná pro clearance HPV infekce). Se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu cervixu jsou spojena i koinfekce HPV a *Ureaplasma urealyticum* (Verteramo et al., 2009).

3.3. Epigenetické změny v karcinomu cervixu

HPV infekce je pro vznik nádoru cervixu nezbytná, ale sama o sobě nestačí. Většina HPV pozitivních lézí se nevyvine v invazivní karcinom. Pro vznik nádorových buněk jsou mimo HPV infekce třeba i genetické a/ nebo epigenetické změny. Nejběžnější molekulární alterací v oblastech cervikální neoplasie je DNA metylace. Methylace genomu roste s nárůstem patologických změn v tkáni (Widschwendter et al., 2004).

V genomu jsou uloženy informace ve dvou formách, genetické a epigenetické. Genetická informace uložená v sekvenci nukleotidů kóduje pořadí aminokyselin v proteinech. Epigenetická informace rozhoduje jak, kdy a kde bude genetická informace přepsána. Jednou z nejdůležitějších epigenetických regulací v savčích buňkách je metylace DNA na cytosinu v pozici 5' v dinukleotidech CpG (Obr. 22.). DNA metylace je během vývoje obratlovců dynamická. Po oplození vajíčka nastává celogenomová demethylace. Během vývoje je pak DNA opět metylována *de novo* metyltransferasami (DNMTs), které jsou naváděny na DNA pomocí sekvence specifických DNA-vazebných proteinů. Nový metylační vzor je při každém dělení zachováván pomocí udržovacích metyltransferas. Metylační vzor se přenáší z mateřské buňky na dceřinou při každém buněčném dělení. To zajišťuje enzym tzv. udržovací metyltransferasa (DNMT1), která metyluje nově vzniklý řetězec DNA podle templátu. Methylace DNA rozhoduje o aktivaci a umlčování genů, represi transkripce, změně struktury chromatinu, inaktivaci X chromosomu, genomickém vtištění (imprinting), umlčení endogenních retrovirů a potlačuje negativní vliv repetitivních a palindromatických sekvencí DNA na integritu genomu. V souvislosti s nádorovým onemocněním je zajímavá především funkce metylace při umlčování a aktivaci genů. Geny mohou být umlčeny prostřednictvím metylace promotoru genu nebo jeho regulačních sekvencí, což brání vazbě proteinů nezbytných pro iniciaci transkripce. Existují však oblasti genomu zvané CpG ostrovy s 10 až 20krát vyšším výskytem CG než je v genomu běžné, které za fyziologických podmínek zůstávají nemetylované. CpG ostrovy se nacházejí v blízkosti promotorů tkáňově specifických genů nebo tzv. housekeepingových genů, jejichž exprese je pro většinu buněk esenciální. DNA metylace je nezbytná pro transkripční

umlcení genů při diferenciaci buněk. Metylace je způsob, jak si buňky pamatují svou specializaci. Diferenciované buňky předávají svůj metylační vzor, informaci o tom, které geny mají být exprimovány, na své dceřiné buňky, při každém buněčném dělení (Alberts et al., 2008; Das & Singal, 2004; Meehan, 2003).



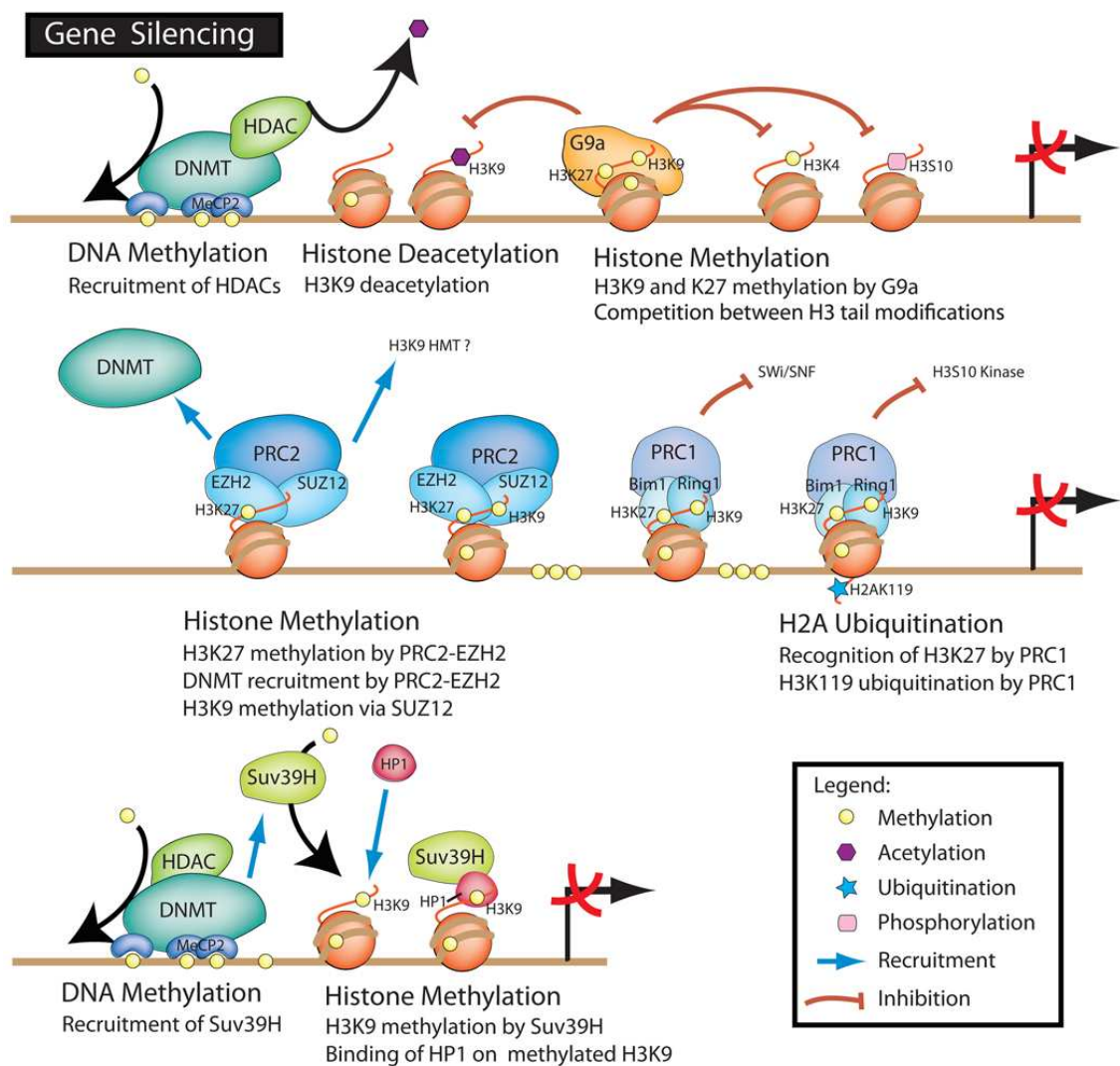
Obr. 22.: Metylační modifikace DNA na 5'-cytosinu

Koenzymem DNMTs přenášejícím metylovou skupinu na 5'-cytosin je SAM (S-adenosyl methionin), který se po reakci mění na SAH (S-adenosyl homocystein) (www.caymanchem.com).

Příčinou maligní konverze buňky může být poškození DNA sekvence genomu jako delece, mutace či translokace úseku DNA, ale i epigenetická změna. V nádorových buňkách dochází ke změnám metylačního vzorce, globální hypometylace je doprovázena hypermetylací ve specifických místech genomu. Hypometylace DNA, tedy transkripční aktivace dříve umlčených genů, je běžná u řady nádorových onemocnění, hepatocelulárních nádorů, karcinomů cervixu, prostaty a hematologických malignit. U řady nádorů např. centrální nervové soustavy, cervixu nebo prsu, je hypometylace známkou nádorové progresse. Hypometylace přispívá k nádorové progresi aktivací onkogenů jako je *c-myc* a *h-ras*, aktivací retrotransposomů či nestabilitou chromosomů. Dlouhé roztroušené jaderné elementy jsou spolu s retrotransposomy nejpočetnější mobilní elementy v lidském genomu. Hypometylace těchto úseků DNA vede aktivaci transkripce řady genů např. *apc* a *c-myc* u karcinomu prsu a střeva. Možným důvodem hypometylace je disrupce genů pro DNMTs, která byla pozorována u řady nádorových onemocnění. V nádorové buněčné linii karcinomu

kolorekta vedla disrupce genu pro DNMT1 a DNMT3B ke snížení imprintingu *igf II*, umlčení tumorsupresorového genu pro p16 (Das & Singal, 2004). V přibližně 80 % CIN byl nalezen hypometylovaný gen pro telomarasu (hTERT), ale v nádorech cervixu už je tento gen metylován (Widschwendter et al., 2004).

Buňky mají několik ochranných mechanismů bránících CpG ostrovy před hypermethyací: aktivní transkripce, aktivní demethylace, načasování replikace a lokální struktury DNA, které zabraňují vazbě DNMTs. Hypermethylací promotoru tumorsupresorových genů dochází k umlčení exprese tohoto genu a deregulaci růstu. CpG oblasti, kam by se za normálních okolností vázaly transkripční faktory, jsou metylované a vážou se zde proteiny s metyl CpG vazebnou doménou (MBD proteiny). Tyto proteiny interagují s histon deacetylasou, následně histon metyltransferasa (HMT) metyluje lysin histonu H3. Na metylované histony se vážou polycomb proteiny, dochází ke kondenzaci DNA (Obr. 23.). Tímto způsobem mohou být umlčeny specifické geny nebo klastry genů (Alberts et al., 2007; Das & Singal, 2004). V nádorech byla nalezena řada hypermetylovaných genů důležitých pro regulaci buněčného cyklu (*p16^{INK4a}*, *p15^{INK4b}*, *rb*, *p14^{ARF}*, *rassf1a*), opravu DNA (*brca1*, *mgmt*), apoptosu (*dapk*, *tms1*), detoxifikaci, diferenciaci, angiogenezi a tvorbu metastáz. Hypermetylované geny se u jednotlivých nádorů liší, gen pro GSTP1 je hypermetylovaný u 90 % nádorů prostaty, ale vysoce demetylovaný u akutní myeloidní leukémie (Das & Singal, 2004). U nádoru cervixu byla nalezena hypermethylace promotorů tumorsupresorových genů pro p16, APC, E-kadherin, RAR-β, potencionální tumorsopresorový gen pro HIC-1, metastatický inhibitor DAPK (death associated protein kinase), BRCA1 a MGMT (*O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*) proteinů účastnících se oprav DNA a dalších. Methylace *hic1*, *apc*, a *brca1* byla běžnější u adenokarcinomu cervixu, zatímco methylace genu pro E-kaderin se vyskytovala je u karcinomu dlaždicového epitelu. Některé metylační změny se dokonce podařilo asociovat nejen s cervikální kancerogenezí, ale i s HPV infekcí (Dong et al., 2001; Narayan et al., 2003), např. methylace *sfrp1* (secreted frizzled-related protein 1), negativní regulátor Wnt signální dráhy, je nezbytná pro transformaci HPV exprimujících buněk. Methylace *sfrp4*, dalšího negativního regulátoru Wnt dráhy, je asociována s HPV16 pozitivními nádory krku a hlavy (Woodman et al., 2007).

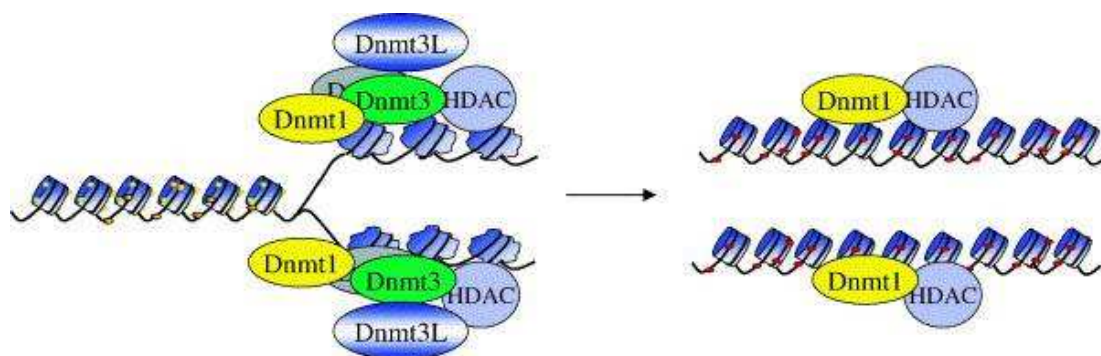


Obr. 23.: Epigenetická regulace genové exprese (Delage & Dashwood, 2008)

Umlčení genové exprese je rozhodující interakce histon-modifikujících enzymů a modifikací histonů. DNMTs (DNA metyltransferasy) katalyzují metylaci DNA a proteiny s metyl-vazebnou doménou (MBD) rekrutují histon deacetylasy (HDAC) a histon metyltransferasy (HMT), které dále reprimují genovou expresi. Tohoto procesu se aktivně účastní PRC(polycomb repressive complex) multiproteinové komplexy. Na H3K9me2 nebo me3 se váže HP1 (histone-binding protein), s nímž interaguje SUV (suppressor of variegation) a původně aktivní chromatin kondenzuje za vzniku heterochromatinu. Histony transkripčně umlčených genů bývají methylované na H3K9, H3K27, H4K20 a H1K26. V aktivním stavu genů jsou histony acetylovány HAT (histon acyltransferasa) a methylovány na H3K4 nebo H3K79. Metylaci CpG DNMTs blokuje vazba transkripčních faktorů na nemetylované CpG a RNA polymeráza II. Vlivem environmentálních či vnitřního prostředí dochází k deacetylaci histonů HDAC (histon deacetylasa) a demethylaci H3K4 LSD1 (lysin-specifická demetylasa 1). V deacetylovaném a demetylovaném stavu histonů je DNA citlivá na metylaci CpG DNMTs. Na metylované DNA se vážou MeCP, které jsou v komplexu s HDAC udržujícími histony demetylované. V tomto stavu se na DNA nemohou vázat transkripční faktory, geny jsou transkripčně umlčeny (Delage & Dashwood, 2008; www.caymanchem.com).

3.3.1. DNMTs

Metylace cytosinu v dsDNA v savcích buňkách zajišťují tři metyltransferasy DNMT1, DNMT3A a DNMT3B. DNMTs jsou nadměrně exprimovány v mnoha solidních a hematologických nádorech (**Woodman et al., 2007**). Aktivita DNMTs je regulována interakcí s dalšími proteiny, posttranskripčně modifikovanými histony, ncRNA (MiRNAs) a posttranskripčními modifikacemi. Mezi posttranskripčními modifikacemi DNMTs řadíme acetylaci, metylaci, fosforylaci, ubiquitinylaci, sumoylaci (tyto modifikace zvyšují jejich enzymatickou aktivitu, stabilitu a interakci s dalšími proteiny), ADP-ribosylaci, citrulinaci, butyrylaci, propionylaci a glykosylaci (**Denis et al., 2011**). Methylace DNA pomocí DNMTs je závislá na interakci DNMTs s EZH2 (polycomb-group family, PcG) proteinem s histon metyltransferasovou aktivitou. Při snížení hladiny EZH2 se snižuje afinita DNMTs k cílovému promotoru, klesá tedy metylace histonů i DNA (**Hayes, 2006**). DNMTs mohou navádět na chromatin HDAC. Během S fáze buněčného cyklu je DNMT1 kolokalizována s HDAC2 v heterochromatinu (**Meehan, 2003**). DNMT1 je udržovací metyltransferasou. Během S fáze je lokalizovaná na replikačním foci, kde interaguje s PCNA. Má větší afinitu k hemimetylované DNA, s níž interaguje prostřednictvím UHRF1. UHRF1 navíc DNMT1 ubiquitinyluje. Ubiquitinylace spolu s acylací Lys 173, 1113, 1115 a 1117 DNMT1 vede za nepřítomnosti HDAC1 a HAUSP k jeho degradaci. Aktivní DNMT1 je v komplexu se SAM (Obr. 22.) a dsDNA s nemetylovanými CpG, s nimiž interaguje CXXC doménou (cystein-rich Zn²⁺ vazebná doména). Pozice CXXC-BAH1 linkeru mezi nemetylovanou DNA a aktivním místem DNMT1 brání *de novo* aktivitě. Tato autoinhibice *de novo* metylace je nezbytná pro zvýšení efektivnosti zachovávající metylační aktivity. V nádorových buňkách byla pozorována i *de novo* aktivita DNMT1 (**Denis et al., 2011**). HPV16 onkoproteiny ovlivňují hladinu a aktivitu DNMT1 v infikovaných buňkách. E7 HPV16 váže DNMT1 a zvyšuje jeho aktivitu. E7 také může zvyšovat expresi genu pro DNMT1, která je řízena transkripčním faktorem E2F1. E7 inaktivuje tzv. kapsovitě proteiny (např. pRB) inhibující funkci E2F transkripčních faktorů (**Woodman et al., 2007**). E6 snižuje hladinu p53, knockdown p53 vede k upregulaci DNMT1 (**Au Yeung et al., 2010**).



Obr. 24.: Model lokalizace udržovací (DNMT1) a *de novo* (DNMT3) metyltransferas během replikace DNA v embryonálních kmenových buňkách

DNMT1 zajišťuje zachování metylačního vzoru po replikaci, pro tuto funkci možná potřebuje přítomnost dalších DNMTs. K metylaci pomocí DNMT3A a/nebo DNMT3B dochází chvíli po replikaci, DNMT1 se uplatňuje později. Vznik neaktivního chromatinu je mimo DNA metylace spojen s deacetylací histonů zprostředkovanou HDACs, které interagují s DNMTs (Meehan, 2003).

DNMT1 má spolu s DNMT3B vliv na zachování stability genomu, především v oblasti centromer. DNMT1 je nezbytná pro zachování metylace tandemové repetitivní DNA sekvence v oblasti centromery, v níž jsou zapojeny i DNMT3. Komplex DNMT3A-DNMT3B/HP1 posiluje stabilitu heterochromatinu. DNMT3B je na rozdíl od DNMT3A nepostradatelná pro metylaci minoritních satelitních repetitivních v centromerické DNA sekvenci. DNMT3A a DNMT3B jsou *de novo* metyltransferasy nezbytné pro embryonální vývoj, metylaci v embryonálních buňkách a embryonálních kmenových buňkách (Obr. 24.). Ztráta obou alel obou genů je pro embryo letální. DNMT3 jsou důležité pro organizaci a kompartmentaci genomu během diferenciace tkání, např. pro tkáňově specifickou genovou expresi. DNMT3 se účastní inaktivace X chromosomu (*de novo* metylace *Xist* a CpG ostrovů na X chromosomu během jeho inaktivace) a genomického vtištění. Funkce DNMT3A a 3B se z velké části překrývají, pro zachování *de novo* metylace stačí, aby byl plně funkční jeden z těchto enzymů, ale není-li přítomen ani jeden funkční gen pro DNMT1, dochází ke ztrátě téměř veškeré DNA metylace bez ohledu na funkčnost DNMT3. DNMT3 jsou vysoce exprimovány v nediferencovaných embryonálních buňkách, po diferenciaci exprese značně klesá a v dospělé somatické tkáni je jejich exprese nízká (Denis et al., 2011; Okano et al., 1999). Aktivitu DNMT3 stimuluje katalyticky neaktivní DNMT3L. DNMT3A a DNMT3B mají PWWP (prolin-tryptofan-tryptofan-prolin) doménu, PHD-like ADD doménu a katalytickou doménu. DNMT3L má pouze ADD doménu. ADD doména všech DNMT3 se selektivně váže na nemetylovaný lysin H3K4. DNMT3L je nezbytná pro imprinting genů v embryonálních buňkách. DNMT3L stabilizuje konformaci aktivního místa DNMT3A a zvyšuje jeho afinitu k SAM. DNMT3A-DNMT3L komplex

preferuje CpG v pravidelné vzdálenosti 8 až 10 bp. DNMT3A i B jsou stabilně ukotveny na nukleosomích somatických buněk obsahujících větší množství metylované DNA. Katalytická aktivita DNMT3A i B je ovlivněna i sekvencemi okolo cílových CpG. DNMT3A enzymatickou aktivitu zvyšuje interakce s H3K36me3 (Denis et al, 2011).

3.3.1.1. DNA metylace a ovlivnění exprese genů HPV

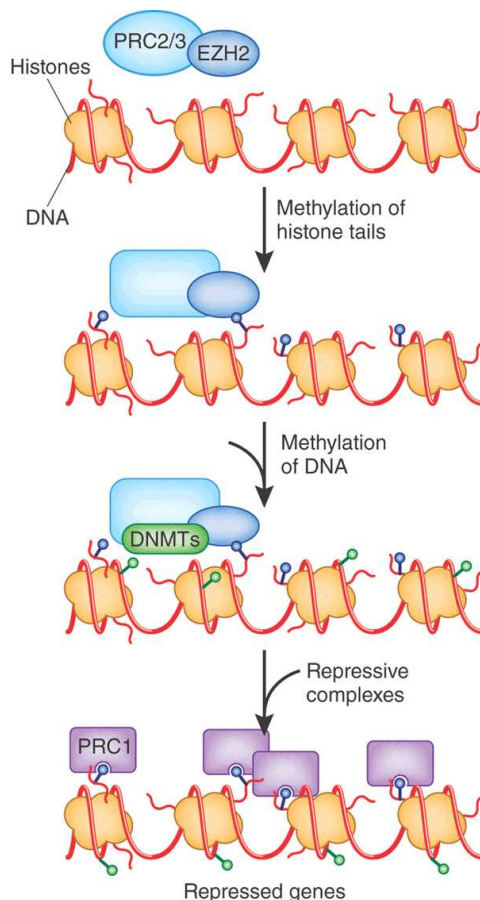
HPV genom bývá v nádorových liniích odvozených od karcinomu cervixu také metylován buněčnými DNMTs. HPV16 a 18 DNA bývá nejčastěji metylována v oblasti L1 ORF. Touto metylací jsou ovlivněny všechny geny exprimované pod promotorem p97 a došlo-li k integraci HPV v oblasti časných genů, nedochází k produkci HPV proteinů. Methylace integrované HPV DNA v nádorových liniích a primárních cervikálních nádorech brání transkripci většiny HPV genů a nechává aktivní maximálně 2 transkripční centra viru v buňce. DNA metylace ovlivňuje transkripčně aktivační funkci E2 proteinu, kterému metylace CpG v E2 vazebném místě brání ve vazbě na DNA. CpG metylace je běžnější v karcinomech než v oblastech dysplasie (Zheng & Baker, 2006).

De novo metylace HPV DNA může být ochranným mechanismem proti transkripci cizí DNA nebo strategií viru pro vytvoření persistentní infekce, popřípadě obojí. Ošetření cervikálních nádorových buněčných linií demetylačním činidlem (5'-azacytidyn) vedlo k reaktivaci metylací deaktivovaného integračního místa HPV. Proto existuje možnost, že by HPV infekce u starších žen mohla být také způsobena reaktivací dříve umlčeného integrovaného HPV genomu (Woodman et al., 2007). Persistentní latentní papillomavirová infekce v klinicky normální tkáni byla zatím prokázána pouze na zvířecích modelech (Maglennon et al., 2011).

3.3.2. Polycomb proteiny

Polycomb proteiny (PcG) byly objeveny jako proteiny nezbytné pro regulaci formování těla *Drosophilamelanogaster*. PcG jsou nehistonové proteiny lokalizované v heterochromatinu. PcG jsou esenciální pro normální vývoj většiny mnohobuněčných organismů a správnou expresi homeotických (*hox*) genů během vývoje. PcG jsou nezbytné pro prevenci nesprávné exprese *hox* genů a homeotické transformace. PcG se také podílí na kontrole buněčného cyklu, nádorové konverzi, stárnutí, inaktivaci X chromosomu, rozhodnutí o osudu buňky a diferenciaci kmenových buněk (Morey & Helin, 2010, Muller & Kassiss, 2009). PcG vytváří multiproteinové komplexy PRC (polycomb repressive complexes) s vlastní enzymatickou aktivitou, pomocí které deaktivují cílové geny (Obr. 23 a 25.). Exprese a aktivita PcG je regulována signálními drahami (např. hedgehog signální dráha) a posttranskripčními modifikacemi (např. fosforylace serinu 1 na EZH2 redukuje afinitu PRC2 ke chromatinu), které ovlivňují jejich vazbu na cílové sekvence, enzymatickou aktivitu a stabilitu PRC komplexů. PRC1 má schopnost repressovat Notch a JAK-STAT

signálních drah, mutace PRC1 PcG vede k jejich aktivaci a možné nádorové konverzi (Morey & Helin, 2010; Wu et al., 2008).

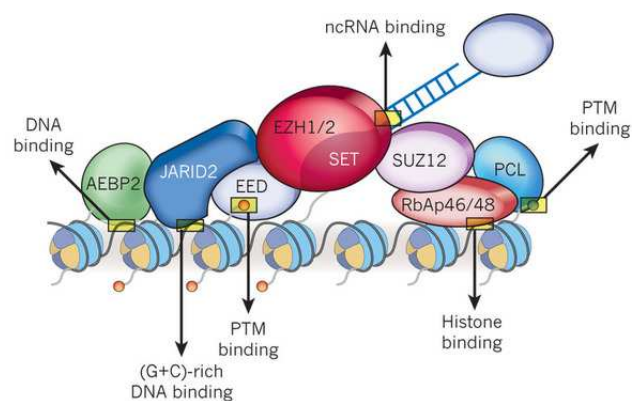


Obr. 25.: Transkripční umlčení genů

PcG protein EZH2 je součástí PRC2/3 a metyluje histon H3K27 (modrý kroužek). EZH2 interaguje s DNMTs a navádí je do regulační oblasti daného cílového genu. DNMTs metylují DNA (zelené body), na níž se mohou metyl vazebnou doménou vázat represivní komplexy jako PRC1 nebo histon deacetylasový korepresor (HDAC) (Mack, 2010).

PRC2 katalyzuje dimetylací či trimetylací H3K27. PRC2 se skládá z katalytické podjednotky EZH2(enhancer of zeste homolog 2), která je aktivní pouze za vazby na dva další PcG proteiny, SUZ12 (suppressor of zeste 12) a EED (embryonic ectoderm development) (Obr. 26.). Podjednotkami PRC2 jsou také proteiny interagující s histony RbAp46 (retinoblastoma-associated protein 46) a RbAp48 a histon deacetylasy HDAC1 a HDAC2 , tyto proteiny však nejsou nezbytné pro histondeacetylasovou aktivitu PRC2. JARID2 podjednotka PRC2 interagující s EZH2 demetyluje histony. EZH2 podjednotka trimetyluje H3K27, vytváří represivní úpravy genů v normálních kmenových či prekursorových buňkách. Trimetylace udržuje pro vývoj důležité geny reprimované, ale je možné je opět aktivovat. Metylace H3K27 brání jeho acetylaci, k níž dochází v nepřítomnosti PRC2. Histony mohou být demetylovány LSD1, UTX nebo JMJD3 a následně acetylovány. Histony jsou acetylovány, je-li promotor v aktivním stavu. Cílové

oblasti PcG v kmenových buňkách jsou však mnohem citlivější na trvalé umlčení než necílové oblasti hypermetylace. Ztráta funkce těchto genů však vede k abnormální klonální expanzi buněk, neoplastické iniciaci a progresi. Pro zachování metylace některých promotorů genů je nezbytná přímá interakce EZH2 s DNMTs. Overexprese onkogenu EZH2 a dalších komponentů PRC2 byla nalezena u řady nádorových onemocnění (Margueron & Reinberg, 2011; Morey & Helin, 2010; Wu et al., 2008). PRC2 downregulace se podílí na senescenci multipotentních kmenových buněk. Při tomto procesu dochází ke snížení exprese HDACs spolu s CpG proteiny (EZH2, BMI1, SUZ12) a upregulací JMJD3, exprese těchto proteinů při senescenci je regulována p16^{INK4A} (Jung et al., 2010).

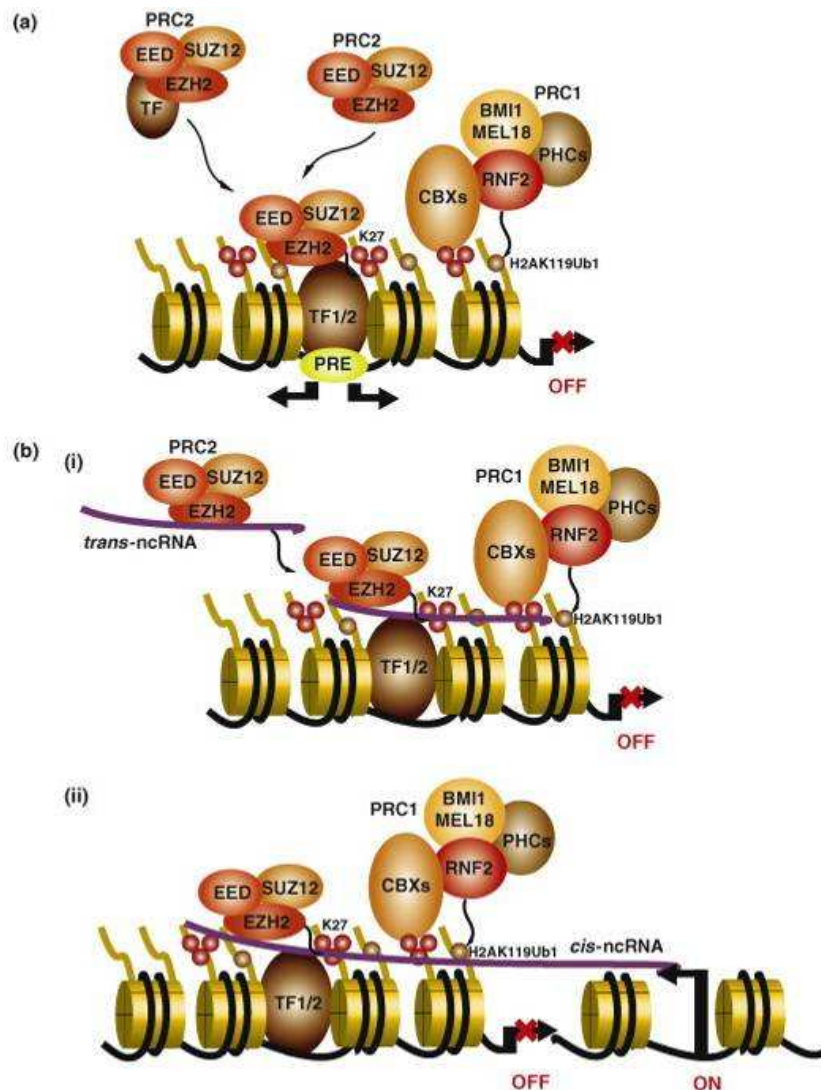


Obr. 26.: Složení komplexu PRC2 v chromatinu a interakce jednotlivých podjednotek s histony či DNA (Margueron & Reinberg, 2011).

PRC1 katalyzuje monoubiquitylaci lysinu 119 (K119) histonu H2A (H2Aub1). E3 ubiquitinligasovou aktivitu mají RING1A a RING1B podjednotky komplexu, jejíž ubiquitylační aktivita je posílena BMI1 (homolog NSPc1). Funkce PRC1 je závislá na navedení na cílový gen za pomoci PRC2. NSPc1-BCOR obsahuje protein s funkcí H3K36 histon demetylasy. Kombinací H2A ubiquitylaci a demetylace histonů NSPc1 přímo umlčuje transkripci genů. H3K27me2, H3K27me3 a H2AK119ub1 jsou histonové represivní značky. H2AK119ub1 vede k umlčení genů indukci kondenzace chromatinu a inhibicí transkripční elongace (brání vazbě FACT). PRC1 asociuje s nehistonovým chromatinovým proteinem CBX4 s E3 SUMO-protein ligasovou aktivitou. CBX4 sumoyluje řadu proteinů včetně *de novo* metyltransferasy DNMT3A (Morey & Helin, 2010; Wu et al., 2008).

Pro porozumění regulaci buněčných procesů PcG proteiny je nezbytné znát mechanismy, kontrolující vazbu PcG na jejich cílové geny. PcG regulují transkripci několika tisíců genů včetně TF určujících další osud buňky, které jsou nezbytné pro expresi

genů charakteristických pro daný typ buněk, PcG proteiny v odlišných typech buněk inaktivují rozdílné geny (**Morey & Helin, 2010**). Mezi elementy, které pravděpodobně regulují vazbu a disociaci PcG na promotory cílových genů patří PREs (polycomb-responsive elements). PREs byly identifikovány jako regulační sekvence *hox* genů, na něž se vážou CpG. PREs jsou dlouhé i několik kb, mohou být lokalizovány desítky kb od počátku transkripce nebo v proximálním promotoru CpG cílových genů. PREs obsahují vazebné místa pro řadu TF a PcG. Mezi PREs identifikované u obratlovců patří PRE-kr, za pomoci rozdílných sekvencí navádí PRC1 a PRC2 na cílové geny (Obr. 27(a)) (**Morey & Helin, 2010; Muller & Kassiss, 2009**). Lokalizací PcG na cílovou sekvenci se účastní i varianty histonů (např. H2AZ). Varianty histonů jsou histony lišící se od standardních histonů primární strukturou, tyto varianty se účastní aktivace a represe transkripce. Pro vazbu PcG na správnou sekvenci jsou důležité i nekódující RNA (ncRNA) (Obr. 27 (b)). ncRNA *trans-HOTAIR* (HOX antisense intergenic RNA) navádí PRC2 na cílovou sekvenci při umlčení *hoxd* klastru genů. Při inaktivaci X chromosomu je nezbytná ncRNA *XIST*, jejíž úsek (*RepA*) asociuje s EZH2 a tím navádí PRC2 na X chromosom. Řada onkogenních TF (např. APL, SNAIL1) má schopnost navádět PRC komplexy na promotory tumorsupresorových genů popř. dalších genů, jejichž umlčení přispívá k nádorové konverzi (**Margueron & Reinberg, 2011; Morey & Helin, 2010**).



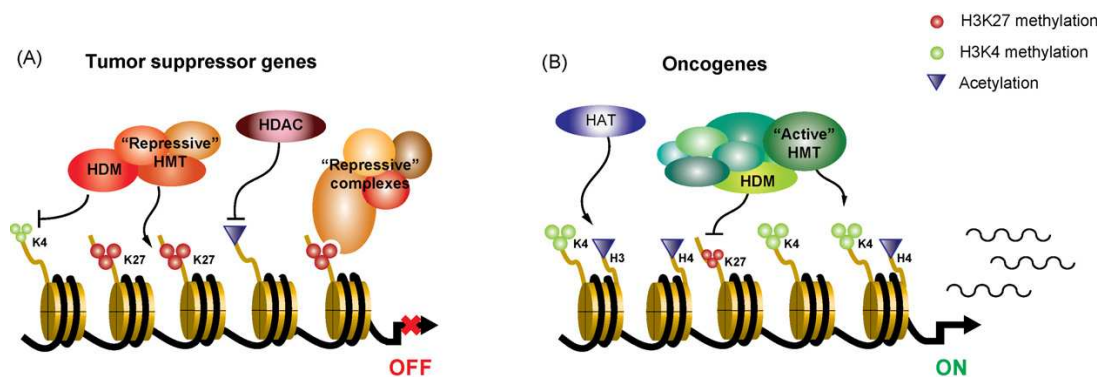
Obr. 27.: Možné způsoby navedení PRC2 na chromatin

PRC2 je na cílové místo v chromatinu nasměrován pomocí TF a ncRNA (a). TF specifické pro daný typ buněk (např. PML-RAR α , PLZF-RAR α) a/nebo TF specifické pro dané geny (např. SNAIL, JARID2) asociují a tím navádí PRC2 na chromatin prostřednictvím PRE (např. PR3-kr3^{kb}). V savčích buňkách zatím nebyly identifikovány proteiny spojující PRC2 s PRE (na obrázku šipky naznačují, že PRE sahá i mimo prostor mezi nucleosomy) (b). *Trans*-ncRNA (např. *HOTAIR*) váže PRC2 a navádí ho na chromatin (i). PRC2 je naváděn *cis*-ncRNA exprimovanou před nebo za PRC2 cílovým genem (ii) (Morey & Helin, 2010).

3.3.3. *N*-Lysin- specifické histon metyltransferasy

NSD (nuclear receptor binding SET domain) proteiny NSD1, NSD2 (MMSET, WHSC1), NSD3 (WHSC1L1), patří do proteinové rodiny tří histon lysin N-metyl transferas (lysin-HMTs). Tyto proteiny se podílí na regulaci aktivity genů (Obr. 28.). Metylace může být signálem umlčení nebo aktivity genu. H3K4me3v blízkosti počátku transkripce spolu s H3K36, jehož četnost se zvyšuje od počátku transkripce ke 3-konci, pozitivně ovlivňuje

transkripci, ale H3K27 me3 ji naopak reprimuje. NSD1 lysin-HMT metyluje H3K36 a H4K20, NSD2 metyluje H3K4 a H4K20, NSD3 metyluje H3K36. Histony mohou být zpět demetylovaný pomocí LSD1 a 2 (lysine-specific histone deacetylase). NSD1 mono nebo dimetylací aktivuje i NF-κB. Kofaktorem NSDs je stejně jako u DNMTs SAM (S-adenosyl methyionin). NSD1 navíc aktivuje RAR (retinoic acid receptor) signální dráhu a spolu s NSD2 a NSD3 se podílí se na degradaci lysinu. NSD2 reguluje vazbu p53-binding proteinu na místo poškození DNA. cH2A-MDC1-NSD2 dráha vede ke vzniku H4K20me2 okolo dvouřetězcových DNA zlomů a následně vazbě p53-binding proteinu. Pokud jsou histony ve formě nukleosomů je substrátem NSD2 H3K36 a H4K20, jsou-li ve formě oktameru, metyluje se primárně H4K44. Amplifikace NSD1 a NSD2 na začátku kancerogeneze vede k nádorové transformaci buněk a snížení hladiny NSD vede k supresi nádorového růstu. NSD1 je asociována s akutní myeloidní leukémií a mnohočetným myelomem, NSD2 s nádorem prostaty a mnohočetným myelomem a NSD3 s karcinomem plic a akutní myeloidní leukémií. Zvýšená hladina NSD2 způsobuje změnu buněčného růstu, adheze a seskupení chromatinu. Nadměrná exprese NSD2 je asociována s aberantním zvýšením výskytu H3K36me2 spolu s nápadným snížením metylace H3K27. Overexprese NSD2 byla nalezena u řady nádorů včetně nádorů ženského pohlavního ústrojí, bývá markerem progresu, agresivity i metastazování nádoru (Albert & Helin, 2010; Morishia & di Luccio, 2011).



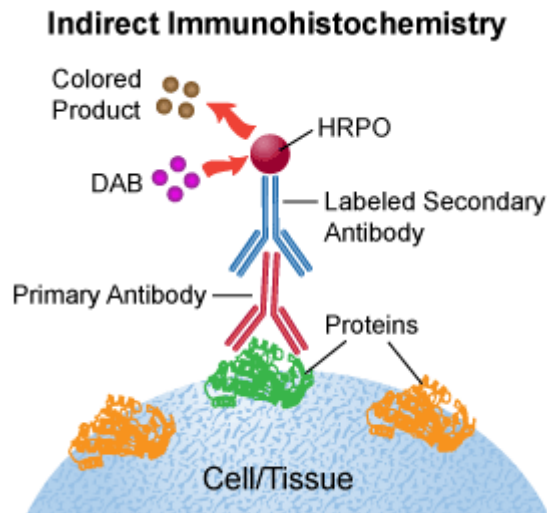
Obr. 28.: Deregulece tumorsupresorových genů a onkogenů modifikací histonů v nádorech Tumorsupresorové geny mohou být modifikací histonů umlčeny (A), onkogeny mohou být aktivovány specifickou metylací a acetylací histonů. Transkripční aktivace onkogenů vede k nadměrné expresi onkogenních proteinů (Albert & Helin, 2010).

VI. EXPERIMENÁLNÍ ČÁST

1. MÍRA EXPRESE EPIGENETICKÝCH MODULÁTORŮ V KARCINOMU CERVIXU

Imunohistochemie (IHC) je v oblasti patologie jednou z neužívanějších metod, mezi jejíž výhody patří vysoká specifita, časová nenáročnost a možná automatizace. Imunohistologická metoda má v běžné praxi především diagnostický, prediktivní a prognostický význam. Toto vyšetření je standardní pro určení hladiny řady prognostických markerů a pro predikci reakce pacienta na cílenou léčbu. Mezi takto vyšetřované markery můžeme zařadit např. receptory pro Her2, estrogen a progesteron, proteiny Ki-67 a Bcl-2, jejichž hladina je určována při tzv. komplexním vyšetření karcinomu prsu.

Cílem IHC je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, interakce antigenu a protilátky. Každý antigen je unikátní a specifický buněčný znak, k jehož detekci užíváme komerčně dodávané a certifikované specifické monoklonální či polyklonální protilátky. Detekovaný antigen se může nacházet na povrchu buněk, v jejich cytoplasmě nebo jádře. Pro svou práci jsem zvolila nepřímou dvoustupňovou imunohistochemickou metodu, která je díky amplifikaci signálu mnohem citlivější než IHC přímá. Na tkáňové řezy se nejprve aplikuje neoznačená protilátka (imunoglobulin) tzv. primární protilátka specifická vůči prokazovanému antigenu. Po navázání protilátky na antigen je vzniklý komplex nutno zviditelnit pomocí protilátky proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete (nejčastěji myš, králík či kůň), z něhož byla primární protilátka získána. Na sekundární protilátku bývá navázán polymer, umožňující amplifikaci signálu. Na polymeru je navázáno několik molekul enzymu, který svým působením přeměňuje chromogen na barvivo. Nejčastěji je používán diaminobenzidin (DAB) oxidovaný za vzniku hnědočerveného barviva. Toto zbarvení je poměrně stabilní a dovoluje dlouhodobější uchování preparátu. Mezi další používané chromogeny řadíme např. FastRed, která má červenou barvu. K nejcitlivější detekci antigenů se užívají fluorescenční barviva (FITC, Cy3 apod.). Pro náš výzkum jsme zvolili sekundární protilátku značenou křenovou peroxidasou (HRPO), která oxiduje DAB (diaminobenzidin) na hnědočervený produkt (Obr. 29.).

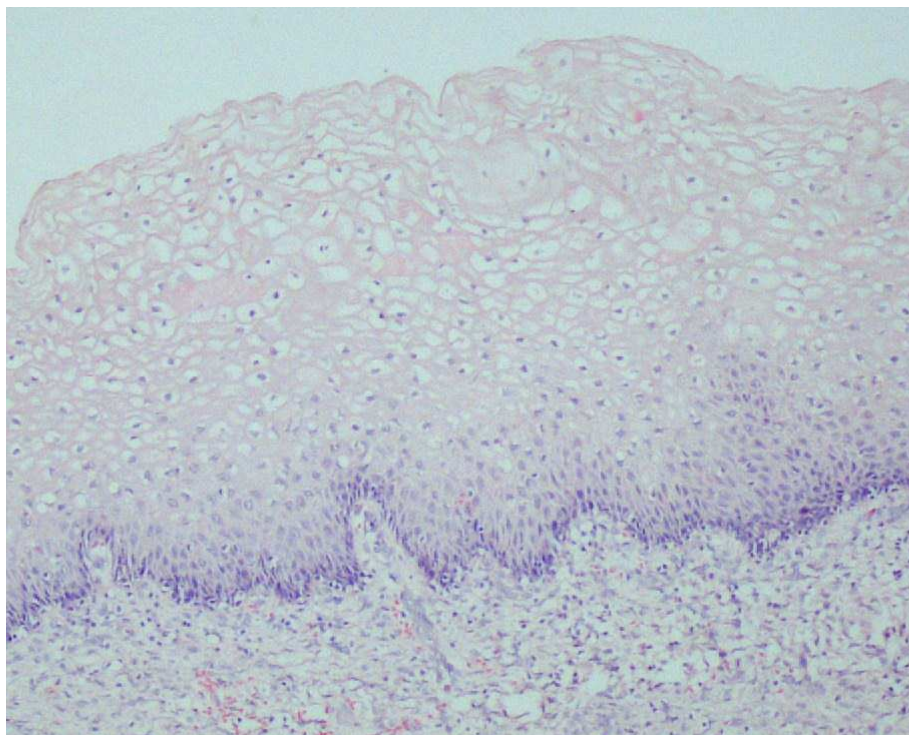


Obr. 29.: Schématické znázornění nepřímé imunohistochemie (www.leinco.com)

Na cílový antigenní determinant se nejprve naváže primární protilátka, na niž se následně váže sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou. Peroxidasa přeměňuje DAB na produkt hnědého zbarvení.

Před provedením vlastního imunohistochemického barvení bylo nutné ověřit, zda má daný vzorek hledanou morfolonii, obsahuje prekarcinózu a/nebo nádorovou tkáň. K tomu jsme použili barvení hematoxylinem-eosinem (H-E). Hematoxylin je bazické barvivo, které modře zbarvuje kyselé součásti buňky tj. DNA, RNA. Mezi buněčné struktury barvící se hematoxylinem patří jádro, jadérko, ribozomy a granulární endoplasmatické retikulum (Obr. 30.). Eosin barví červeně zásadité struktury buňky (acidofilní, eosinofilní) obsahující hlavně proteiny, tj. cytoplasmu, mitochondrie, hladké endoplasmatické retikulum a kolagen v mezibuněčné hmotě (Obr. 30.). Nádorové buňky poznáme podle nápadně většího jádra. Všeobecně je možno říci, že na řezu cervixem obarveném H-E v oblasti nádoru převažuje modré zbarvení jader.

Po obarvení H-E můžeme pod mikroskopem rozeznat i jednotlivé buňky napadené HPV, tzv. koilocyty. Koilocyty jsou zvětšené buňky s perinukleárním projasněním cytoplasmy a pyknotickým jádrem s nepravidelnou membránou na povrchu.



Obr. 30.: Řez normálním epitelem cervixu (barvení H-E)

Na řezu epitelem se nejintenzivněji barví bazální vrstva, kde dochází k neustálému dělení buněk nezbytnému pro zachování epitelu.

Během své práce jsem používala protilátky specifické vůči epigenetickým modulátorům DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 a WHSC1 (NSD2). Cílem tohoto projektu bylo optimalizovat imunohistochemickou metodu detekce metyltransferas pro cervikální tkáň a zjistit, zda se liší exprese těchto epigenetických regulátorů ve zdravé cervikální tkáni, u prekarcinóz a invazivního nádoru a má-li na jejich hladinu vliv přítomnost HPV infekce popř. přítomnost integrované nebo episomální formy HPV.

1.1. Materiál a pomůcky

Polyklonální protilátka proti DNMT1 (Abcam), protilátka proti DNMT3A (Imgenex), protilátka proti DNMT3B (Sigma-Aldrich), protilátka proti EZH2 (Cell Signaling), protilátka proti WHSC1 (Sigma-Aldrich), EnVision™ Detection Systems Peroxidase/DAB Rabbit/Mouse (Dako), Mayersův hematoxylin, eosin, histoclear, 99% etanol, Scottova náhražka vody, DPX, IMS, 30% peroxid vodíku (Sigma), kasein 10x (Vector Laboratories), Tween 20 (Sigma), ethidium bromid, agaroasa, trisodium citrát dihydrát, kyselina citronová, DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), buněčné linie HeLa, SiHa, Ca Ski, H929, Archie, 2x Thermo-Start™ High Performance ReddyMix™ PCR Master mix (Thermo Fisher Scientific), specifické primery (AltaBioscience), loading dye 6x (Promega), marker 1Kb (Invitrogen), krycí a podložní skla, PCR zkumavky, mikrozukavky, špičky,

špičky s filtrem, pipety (Eppendorf), předvážky, pH metr (Omega), elektrické míchadlo, GeneFlash (Syngene) mikrovlnná trouba, Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), vortex, termoblok (Techne), chlazená centrifuga (Eppendorf), centrifuga (Fisher Scientific), elektroforetické vany, zdroj napětí, světelný mikroskop Elipse E400 (Nikon).

1.2. Vzorky patientských tkání

Pro optimalizaci byly použity vzorky krčních mandlí (tonsily) a kůže. Byl vybrán soubor 65 patientských vzorků tkání potenciálně obsahujících karcinom děložního hrdla (poskytnuté Walsgrave Hospital v Coventry). Pro experimenty byly použity histologicky ověřené 4 µm silné řezy parafinových bloků tkání fixovaných formalínem.

1.3. Složení roztoků

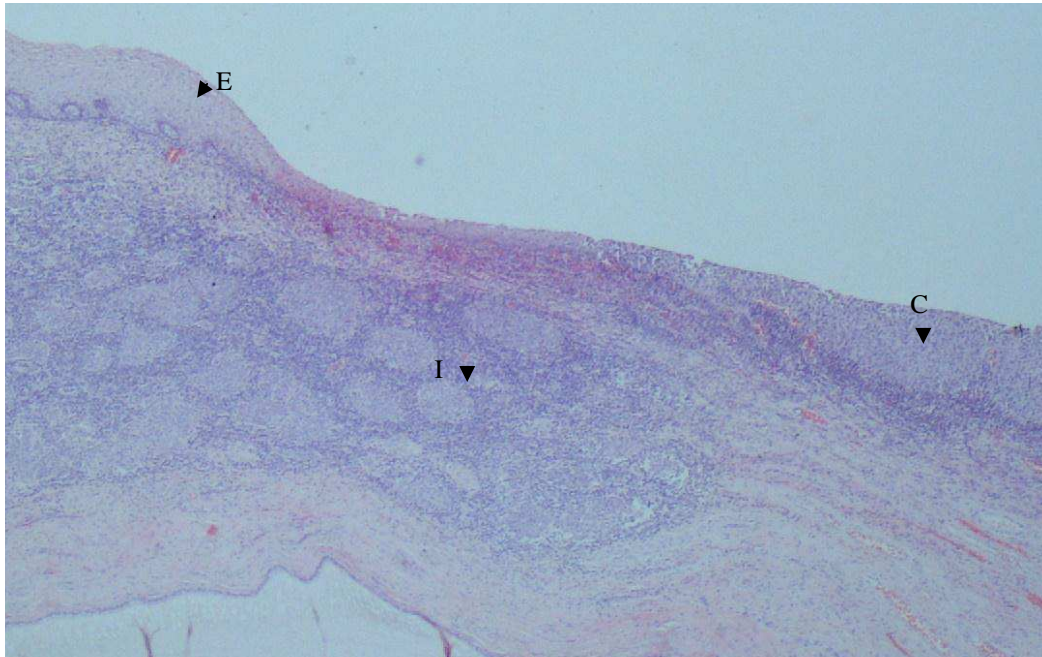
0,3% H ₂ O ₂	30% H ₂ O ₂ (w/w); methanol
Citrátový pufr	4,3 mM trisodium citrát dihydrát; 1,2 mM monohydrát kyseliny citronové (pH 6)
1x TBST pufr	50 mM Tris.HCl; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20(pH 7,6)
5x kasein	10x kasein, 10x PBS
10x PBS	1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na ₂ HPO ₄ ; 8 mM KH ₂ PO ₄ ;(pH 7,3)
1x TBE	89 mM Tris Base; 89 mM kys. boritá; 2 mM EDTA (pH 8,3)
2% agarosový gel	2g agarosy, 100 ml 1x TBE, 10 µl ethidium bromidu
2,5% agarosový gel	2g agarosy, 100 ml 1x TBE, 10 µl ethidium bromidu

1.4. Použité metody a pracovní postupy

1.4.1. Barvení hematoxylinem a eosinem

Před vyšetřením tkáně pomocí imunohistochemie bylo nutné z 65 dostupných parafinových bloků vybrat pouze ty, které obsahují prekarcinózu a/nebo nádor. K ověření morfologie jednotlivých vzorků tkáně jsme použili barvení Mayersovým hematoxylinem a 1% eosinem. Nejprve bylo nutné tkáň deparafinizovat, parafinové řezy jsme ponořili na 10 min do histoclearu a pro odmaštění na 2 min do 99% etanolu. Následovala rehydratace, 2 min v 90% etanolu, 2 min v 70% etanolu a promytí studenou tekoucí vodou. Vzorky jsme barvili 2 min v Mayersově hematoxylinu, jehož přebytek jsme odmyli teplou tekoucí vodou, 2 min lázní ve Scottově náhradě vody a opětovným promytím tekoucí vodou. Následovalo barvení eosinem (2 min) s odmytím přebytku barvy pod tekoucí vodou. Vzorky byly nakonec opět dehydratovány, 2 min v 90% ethanolu, 2 min v 70% etanolu a 5 min v histoclearu. Do oblastí vzorku jsme nanесли 2-3 kapky DPX a zakryli krycím sklíčkem. Trvalé preparáty jsme pozorovali pod světelným mikroskopem. Na základě

morfolgie tkáně byly od každého pacienta vybrány ty parafinové bloky, které obsahovaly invazivní nádor a/nebo prekarcinózy (CIN3). Tímto způsobem bylo z původních 65 pacientů vybráno 25, jejichž vzorky měly hledanou morfolgií. Výběr vhodných vzorků tkáně a hodnocení morfolgie probíhalo pod dohledem zkušeného patologa (Dr. M. Pereira).



Obr. 31: H-E barvený řez cervikální tkáně obsahující invazivní nádorovou tkáň (I), CIN3(C) i normální epitel (E).

1.4.2. Imunohistochemie

Vybrané vzorky tkáně byly deparafinizovány v lázni histoclearu (10 min), následně ponořeny na 10 min do IMS a omyty destilovanou vodou. Blokace endogenní aktivity peroxidasy byla provedena 15 min lázní v 0,3% peroxidu vodíku. Následně byly vzorky vloženy do citrátového pufru, který se před tím 10 minut vařil v mikrovlnné troubě (800 W). Vzorky byly ponechány v pufru v mikrovlnné troubě na 10 min při 450 W a poté na dalších 10 min při 80 W. Nádobu se vzorky jsme vyjmuli a nechali 30 min ochladnout. Po opláchnutí řezů tkáně tekoucí vodou (5 min) následovalo omytí 1x TBST pufrem (pH 7,6; 5 min) a blokování nespecifických signálů 5x kaseinem (10 min). Vzorky jsme promyli 10x PBS a inkubovali přes noc při 4° C se 100 – 200 µl primární protilátky naředění 10x PBS. Při optimalizaci jsme začínali na ředěních 1:200, 1:400 a 1:800, podle výsledků zbarvení při těchto ředěních jsme koncentrace jednotlivých protilátek dále upravovali. Konečné ředění protilátek a druh tkáně, na níž probíhala optimalizace, jsou uvedeny v Tab. 12..

Další den jsme vzorky tkáně třikrát po 5 min opláchli v 1x TBST a inkubovali 30 min při pokojové teplotě s 1-2 kapkami sekundární protilátky Dako REAL EnVision HRP Rabbit/Mouse. Tkáň jsme třikrát po 5 min opláchli 1x TBST. Na vzorky jsme aplikovali 100-150 μ l DAB substrátu a inkubovali jsme je 3 min při laboratorní teplotě, následovalo promytí pod tekoucí vodou po dobu 5 min. Tkáň jsme barvili 3 min v hematoxylinu, jehož přebytek jsme odstranili 5 min promytím tekoucí vodou. Vzorky jsme na 10 min ponořili do IMS a pak do histoclearu. Do oblasti vzorku jsme aplikovali 2 kapky DPX, přiložili krycí sklíčko a nechali zaschnout. Preparáty jsme pozorovali pod světelným mikroskopem. Před aplikací této metody na patientských vzorcích bylo nezbytné zoptimalizovat ředění jednotlivých protilátek. Optimální ředění protilátek a druh tkáně použité k optimalizaci jsou uvedeny v Tab. 12. Intenzita zbarvení jednotlivých preparátů byla hodnocena pomocí H skóre (% pozitivních buněk x intenzita barvení vyjádřena subjektivně třemi stupni, 0 - žádná, 1 - slabá, 2 - střední, 3 - silná). H skóre nabývá hodnot 0-300). Vnitřní pozitivní kontrolou každého vzorku byla bazální vrstva cervikálního epitelu daného preparátu a vnitřní negativní kontrola byly buňky nacházející se ve vyšších vrstvách fyziologického epitelu. Skórování jednotlivých patientských vzorků probíhalo za dozoru kvalifikované patologky Dr. M. Pereira.

1.4.3. Izolace DNA z parafinových řezů tkáně

Pro izolaci DNA byl použit kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Koncentrace získané DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop TM (čistota DNA, podíl absorbancí 260/280 nm se pohyboval mezi 1,8 a 2,0). Alikvoty jednotlivých vzorků byly naředěny sterilní vodou na koncentraci 20 ng/ μ l. Zásobní i naředěné vzorky DNA byly skladovány při teplotě -20°C. DNA izolovaná z buněčných linií byla také neředěna sterilní vodou na koncentraci 20 ng/ μ l a skladována stejným způsobem jako DNA vzorků.

1.4.4. PCR reakce

PCR reakce byla použita pro zjištění HPV 16 a HPV18 positivity patientských vzorků a u pozitivních vzorků byla pro ověření přítomnosti episomální či integrované formy HPV testována fragmentace genů E2 (HPV16) a E2 (HPV18). Dostatečná kvalita izolované DNA a optimální množství DNA používané pro PCR reakci bylo zjištěno pomocí testu na gen pro β -globin. Pro ověření správnosti výsledků byla pro každý test použita negativní kontrola a pozitivní kontrola (DNA izolovaná z buněčné linie). Pro ověření správnosti testů fragmentace E2 byla použita pozitivní kontrola, negativní kontrola a tzv. negativní negativní kontrola (voda). Pro veškeré reakce byl použit 2x Thermo-Start High Performance PCR Master mix a sterilní voda. Všechny reakce proběhly v přístroji PCR termocycleru značky Eppendorf. Testy pro optimalizaci množství DNA potřebné pro reakci a testy pro zjištění

HPV 16 a HPV 18 pozitivita byly provedeny v duplexu. Jednotlivé PCR reakce jsou v této kapitole dále blíže popsány. PCR produkty byly analyzovány na 2% agarosovém gelu (2,5% agarosový gel pro HPV16 and 18 typizaci), 120V, 300mA po dobu 20 min. (malý gel), 30 min. (střední gel) nebo 40 min. (velký gel).

1.4.4.1. Použité primery

Tab. 1: Sekvence použitých primerů

β-globin	GH20	5' -GAAGAGCCAAGGACAGGTAC -3'
	PCO4	5' -CAACTTCATCCACGTTCCACC -3'
HPV16 E6	FW primer	5' -GAACAGCAATACAACAAACC -3'
	RW primer	5' -GATCTGCAACAAGACATACA -3'
HPV16 E2 Primer set 1	FW primer	5' -AGGACGTGGTCCAGATTAAG -3'
	RW primer	5' -TCAAACCTGCACTTCCACTGT -3'
HPV16 E2 Primer set 2	FW primer	5' -TAACTGCACCAACAGGATGT -3'
	RW primer	5' -GCCAAGTGCTGCCTAATAAT -3'
HPV16 E2 Primer set 3	FW primer	5' -ATCTGTGTTTAGCAGCAACG -3'
	RW primer	5' -TAAATGCAGTGAGGATTGGA -3'
HPV16 E2 Primer set 4	FW primer	5' -ACAGTGCTCCAATCCTCACT -3'
	RW primer	5' -TCACGTTGCCATTCCTATC -3'
HPV16 E2 Primer set 5	FW primer	5' -GGCATTGGACAGGACATAAT -3'
	RW primer	5' -CAAAAGCACACAAAGCAAAG -3'
HPV18 E7	FW primer	5' -GTTGACCTTCTATGTCACGA -3'
	RW primer	5' -CAATTCTGGCTTCACACTTA -3'
HPV16 E2 Primer set 1	FW primer	5' -TCCAGATTAGATTTGCACGA -3'
	RW primer	5' -CAATTGTCTTTGTTGCCATC -3'
HPV16 E2 Primer set 2	FW primer	5' -ATACAAAACCGAGGATTGGA -3'
	RW primer	5' -ACTTCCCACGTACCTGTGTT -3'
HPV16 E2 Primer set 3	FW primer	5' -AACACAGGTACGTGGGAAGT -3'
	RW primer	5' -TTTCGCAATCTGTACCGTAA -3'
HPV16 E2 Primer set 4	FW primer	5' -GACCTGTCAACCCACTTCT -3'
	RW primer	5' -ACATGGCAGCACACATACAT -3'

1.4.4.2. Použité buněčné linie

Tab. 2.: Buněčné linie, jejichž DNA byla používána jako kontrola

Buněčná linie	Původ	HPV
H929	Myelom	neg.
SiHa	SCC cervixu	16 integr.
HeLa	Adenokarcinom	18 integr.
CaSki	Kožní nádor	16 episom. i 18
Archie	Keratinocyty*	18 episom.

* ketatinocyty transfekované HPV18

1.4.4.3. Optimalizace množství DNA použitého pro následující reakce

Pro tuto PCR reakci byly použity primery PCO4 a GH20 (Tab. 1.). Mix primerů byl připraven z 0,5 μ l 10 μ M PCO4 primeru a 0,5 μ l 10 μ M GH20 primeru, konečná koncentrace primerů ve 25 μ l PCR mixu byla 0,4 μ M. Velikost PCR produktu byla 268 bp (**Winder et al., 2009**). Jako pozitivní kontrolu jsme použili buněčnou linii H929.

Tab. 5.: Složení PCR mixů pro 1 PCR reakci u testu na β -globin pro vzorky a kontrolu

	PCR mix- vzorek	PCR mix- kontrola
Master mix	12,5 μ l	12,5 μ l
Primer mix	1 μ l	1 μ l
DNA	3 μ l	1,5 μ l
Voda	8,5 μ l	10 μ l

Tab. 6.: Program pro PCR reakci

PCR program			
Predenaturace	95°C	15 min.	40 cyklů
Denaturace	95°C	1 min.	
Annealing	55°C	1 min.	
Elongace	72°C	1 min.	
Konečné prodloužení	72°C	10 min.	
Konec	4°C	∞	

1.4.4.4. HPV16 a HPV18 typizace

K této PCR reakci jsme použili primery HPV 16 E6 a HPV 18 E7 (Tab. 1.). Mix primerů byl připraven z 1,25 μ l 10 μ M forward primeru a 1,25 μ l 10 μ M reverse primeru, konečná koncentrace primerů ve 25 μ l PCR mixu byla 1 μ M. Velikost PCR produktu byl pro HPV16 152 bp a pro HPV18 113 bp. (**Collins et al., 2009**). Pro HPV 16 byla pozitivní kontrolou buněčná linie SiHa a pro HPV 18 buněčná linie CaSki.

Tab. 7.: Složení PCR mixů pro 1 PCR reakci pro HPV typizaci pro vzorky a kontrolu

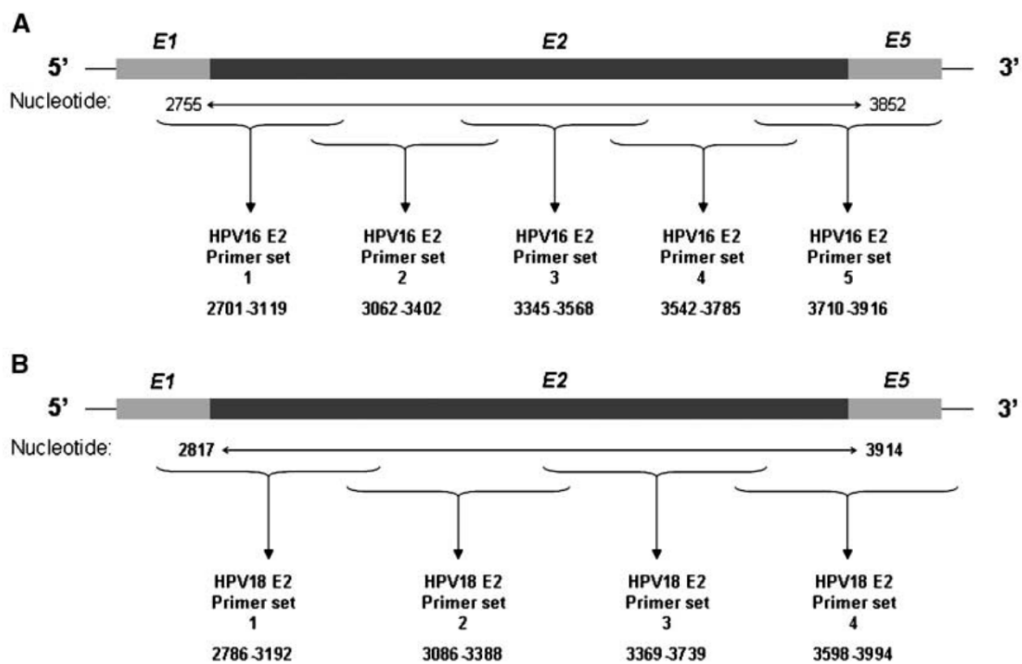
	PCR mix- vzorek	PCR mix- kontrola
Master mix	12,5 µl	12,5 µl
Mix primerů	2,5 µl	2,5 µl
DNA	6 µl	3 µl
Voda	4 µl	7 µl

Tab. 8.: Program pro PCR reakci HPV typizace

PCR program			
Predenaturace	95°C	15 min.	40 cyklů
Denaturace	95°C	30 s	
Annealing	58°C	30 s	
Elongace	72°C	40 s	
Konečné prodloužení	72°C	10 min.	
Konec	4°C	∞	

1.4.4.5. Určení přítomnosti episomální či integrované formy HPV

Přítomnost episomální či integrované formy HPV jsme zjišťovali pomocí PCR reakce za užití primerů pro jednotlivé fragmenty genu pro protein E2, k jehož fragmentaci dochází při integraci nejčastěji (Obr. 32.). Pro HPV16 jsme použili primery HPV16 E2 set 1-5 (Tab. 1.), pozitivní kontrolou byla buněčná linie CaSki (episomální HPV16) a negativní kontrola HeLa (HPV18). Pro HPV 18 pozitivní vzorky byly použity primery HPV18 E2 set 1-4 (Tab. 1.), pozitivní kontrolou byla buněčná linie Archie (episomální HPV18) a negativní kontrolou HeLa (integrovaný HPV18). K přípravě všech mixů primerů pro jednotlivé fragmenty bylo použito 0,5 µl o 10 µM FW primeru a 0,5 µl o 10 µM RW primeru. Konečná koncentrace primerů ve 25 µl PCR mixu byla 0,4 µM (Collins et al., 2009).



Obr. 32.: Lokalizace primerů použitých pro amplifikaci překrývajících se úseků genu E2 HPV16 (A) a genu E2 HPV18 (B). Nukleotidy jsou číslovány podle sekvence celého genomu jednotlivých HPV (Collins et al., 2009).

Tab. 9.: Velikost jednotlivých fragmentů E2 genu HPV16 a HPV18

Velikost E2 fragmentů	HPV16	HPV18
Fragment 1	419 bp	407 bp
Fragment 2	341 bp	303 bp
Fragment 3	224 bp	371 bp
Fragment 4	244 bp	397 bp
Fragment 5	207 bp	-

Tab. 10.: Složení PCR mixu pro 1 PCR reakci (stejně pro všechny sady primerů)

	PCR mix-vzorek	PCR mix-kontrola
Master mix	12,5 µl	12,5 µl
Mix primerů	1 µl	1 µl
DNA	6 µl	5 µl
Voda	5,5 µl	6,5 µl

Tab. 11.: PCR program pro zjištění E2 fragmentace (pro všechny sety primerů byly podmínky PCR reakce stejné).

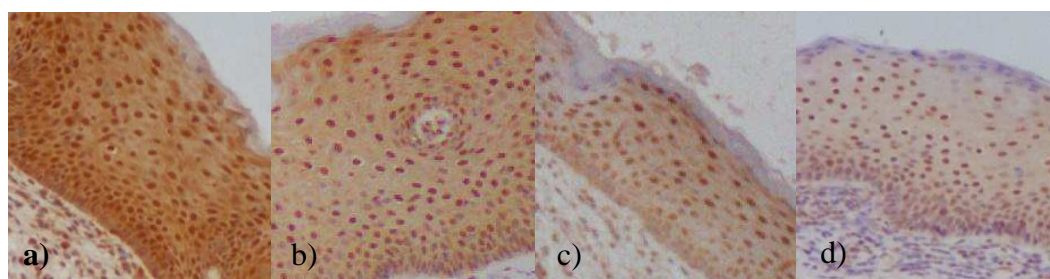
PCR program			60 cyklů
Predenaturace	95°C	5 min.	
Denaturace	95°C	30 s	
Annealing	54°C	1 min.	
Elongace	72°C	2 min.	
Finální prodloužení	72°C	10 min.	
Konec	4°C	∞	

1.5. Výsledky

Imunohistochemickou metodu podařilo se optimalizovat pro všech pět protilátek (Tab. 12.). Pro optimalizaci jsme vždy volili tkáň, o níž je známo, že při IHC se danou protilátkou barví silně např. DNMT3B a jádra epiteliálních buněk kůže (Tab. 12.). Při hledání ideální koncentrace protilátky jsme začínali s ředěním protilátky 10x PBS 1:200, 1:400 a 1:800. Podle intenzity zbarvení jader buněk a pozadí u těchto ředění, jsme koncentraci protilátky dále optimalizovali (Obr. 33.). Po optimalizaci jsme metodu aplikovali na pacientské vzorky.

Tab. 12.: Použité ředění protilátek v 10x PBS

Protilátka	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	EZH2	WHSC1
Původ	králík	myš	myš	králík	králík
Ředění	1:1200	1:200	1:2000	1:200	1:200
Tkáň pro optimalizaci	tonsila	cervix	kůže	cervix	tonsila



Obr. 33.: Optimalizace protilátky DNMT3B na parafinovém řezu kůže

Postupné ředění protilátky od 1:200(a), přes 1:800 (b), 1:1000 (c) až na optimální koncentraci 1:2000 (d), kde již nedochází k zbarvení pozadí (cytoplasmy).

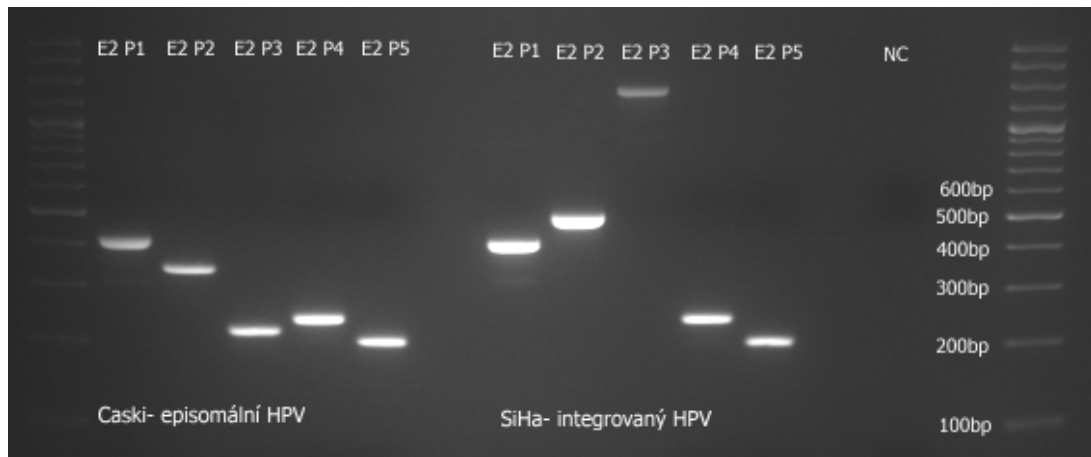
Z původních 65 pacientských vzorků bylo na základě H-E barvení vybráno 24 pacientských vzorků, které na řezu tkání měly prekancerotické změny a/nebo nádor. 16 z 24 (67 %) vzorků obsahovalo skvamózní karcinom (SCC), 6 adenokarcinom cervixu (25 %),

1 (4%) adenosquamous karcinom cervixu a 1 (4%) lymphoepithelioma-like cervikální karcinom. U všech 24 vzorků byla provedena HPV typizace a při dostupnosti materiálu byly vyšetřeny sledované markery pomocí IHC. Ve většině případů vykazovaly CIN3 i oblasti nádoru overexpresi DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, WHSC1 i EZH2. Míra exprese epigenetických regulátorů v CIN3 a nádorové tkáni se příliš nelišily. Největší overexpresi jsme pozorovali u DNMT1 a EZH2, u ostatních zkoumaných proteinů se H skóre pohybovalo okolo hodnoty 100 (Příloha 1.).

Z 24 patientských vzorků bylo 19 (79 %) HPV16 a/nebo HPV18 pozitivních (Tab. 13.). HPV16/18 negativní vzorky jsou pravděpodobně infikovány jiným typem HPV viru. Všechny HPV18 pozitivní vzorky obsahovaly SCC. HPV18 infekce by mohla hrát významnou roli ve vzniku skvamózního karcinomu. Výskyt HPV16 infekce byl pozorován rovnoměrně u všech typů karcinomů a prekarcentózní tkáně. V našem souboru pacientů byl u HPV16+ vzorků stejný výskyt episomální i integrované formy viru, všechny HPV18+ vzorky však byly výhradně integrované (Příloha 2.). Míra exprese epigenetických markerů se u integrované i episomální formy významně lišila. U HPV16I pozitivních vzorků jsme pozorovali signifikantně vyšší overexpresi DNMT1 (Obr. 35.) a DNMT3B (Obr. 36.) než u episomálních HPV16 vzorků. U ostatních epigenetických markerů se nám nepodařilo změnu exprese při vzniku karcinomu cervixu prokázat.

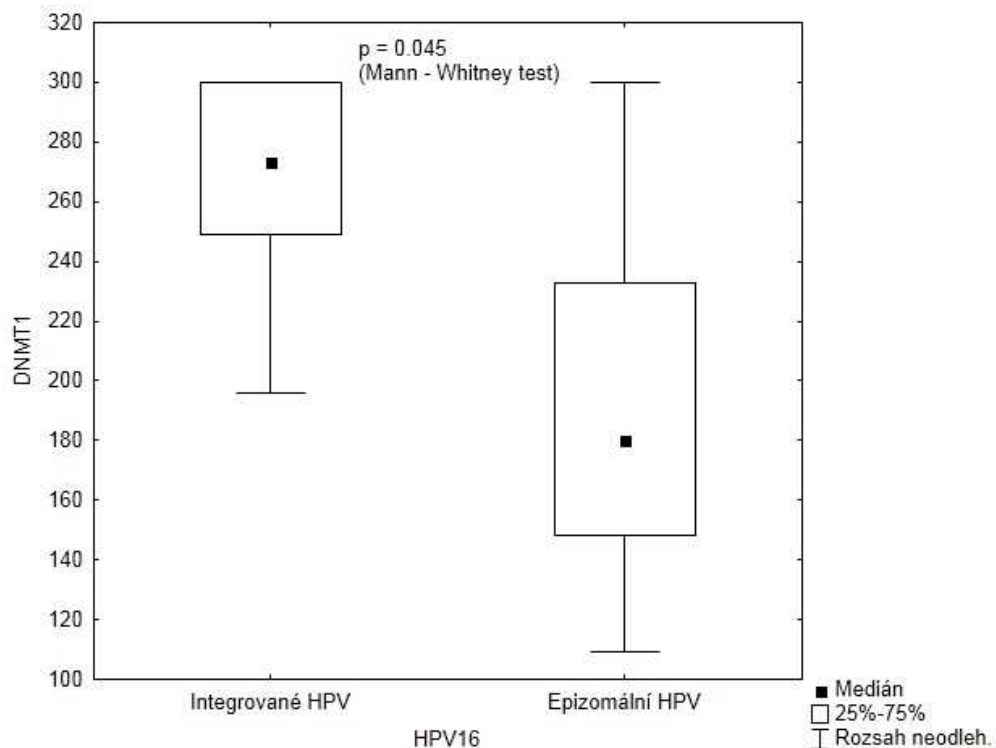
Tab. 13.: HPV typizace a určení integrované (I) či episomální (E) formy HPV

		I	E
HPV+	19	11	9
HPV16+	18	9	9
HPV 18+	4	4	0
HP16/18+	3	3	1

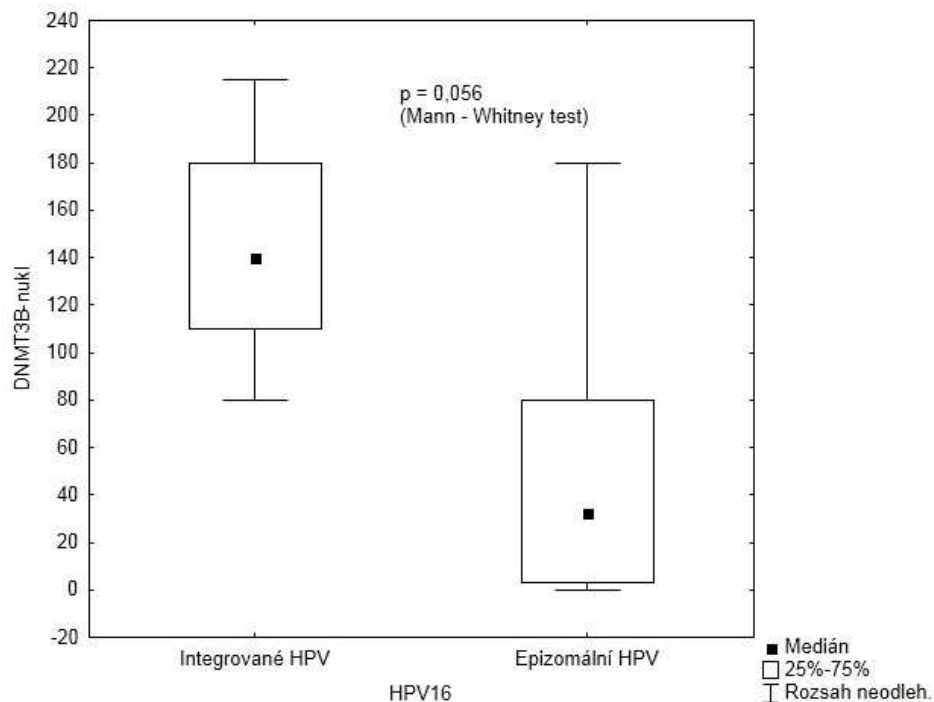


Obr. 34.: Episomální a integrovaná forma HPV v buněčných liniích

Episomální HPV16 má velikosti fragmentů genu pro E2 413bp (E2 P1), 348bp (E2 P2), 223bp (E2 P3), 242bp (E2 P4) a 206bp (E2 P5). Integrovaný virus dává po PCR reakci fragmenty odlišné velikosti (např. nádorová linie SiHa) nebo nevznikají žádné PCR produkty příslušného fragmentu.



Obr. 35.: Overexprese DNMT1 je signifikantně vyšší u nádorů s integrovanou formou HPV16 v porovnání s episomálním HPV16.



Obr. 36.: U nádorů s integrovanou formou HPV16 je míra exprese DNMT3B významně vyšší než u epizomálních HPV16.

1.6. Diskuse

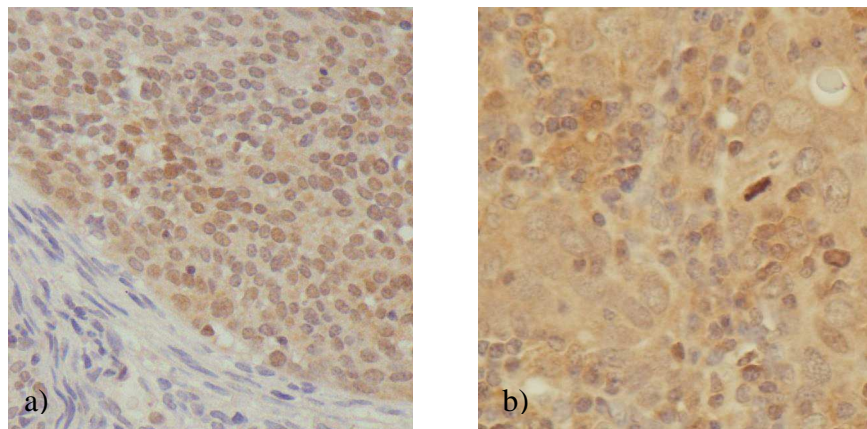
U všech námi sledovaných epigenetických regulátorů, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 a WHSC1, byla popsána účast na kancerogenezi a jsou overexprimovány v řadě nádorových onemocnění (Morey & Helin, 2010; Morishia & di Luccio, 2011; Woodman, 2007). Byla popsána overexpresi DNMT1, 3A i 3B u karcinomu cervixu i v buněčných liniích od něj odvozených (HeLa, SiHa, Caski) (Narayan et al., 2006; Luczak et al., 2012). Naše výsledky potvrdily overexpresi DNMTs u karcinomu cervixu a potvrdily tak významnost regulace těchto epigenetických markerů při rozvoji cervikálního karcinomu. U CIN3 stádia byla overexpresi DNMTs rovněž nalezena, což potvrzuje deregulaci DNMTs již u tohoto prekancerózního stádia. Díky omezenému množství materiálu se nám však nepodařilo epigenetické markery vyšetřit u všech vzorků a zjistit tak, zda se exprese u prekanceróz a nádorových onemocnění významně liší či nikoli. Nejvyšší overexpresi vykazovaly DNMT1 a EZH2 proteiny.

U DNMT1 byla popsána změna exprese v průběhu kancerogeneze cervixu. Hladina exprese DNMT1 rostla od CIN nízkého stupně do CIN3, u mikroinvazivních nádorů byla hladina exprese DNMT1 stejná jako u CIN3, ale u invazivních nádorů klesala (Sawada et al., 2007). V našem souboru pacientů se míra overexpresi mezi CIN3 a invazivním nádorem významně nelišila. Nicméně rozdíl v expresi DNMT1 byl pozorován mezi epizomální a integrovanou formou HPV16. U pacientek s integrovanou

formou HPV16 viru byla pozorována vyšší overexpresi DNMT1 než u pacientek s episomální formou infekce. Vyšší overexpresi DNMT1 u HPV16I než u HPV16E lze vysvětlit deregulací exprese E6 a E7 v HPV16I nádorech. E6 snižuje hladinu p53, knockdown p53 vede k upregulaci DNMT1 (Au Yeung et al., 2010). Interakce DNMT1 s E7 HPV16 vede ke zvýšení aktivity DNMT1. Inhibice pRB E7 proteinem způsobuje uvolnění E2F a zvýšení exprese genu pro DNMT1 (Woodman et al., 2007). Podobné regulace exprese a/nebo aktivity DNMT3 HPV proteiny dosud nebyly popsány, nicméně lze předpokládat podobný mechanismus. Integrace HPV16 do hostitelského genomu u našeho souboru pacientů vedla k vyšší overexpresi DNMT3B než v HPV16E pozitivních vzorcích. Formu HPV jsme určovali pomocí testu disrupce E2. K E2 fragmentaci dochází na začátku infekce HPV16 a 18, integrované formy HPV nalezneme již v CIN nízkého stupně. Zvolený test E2 disrupce není schopen detekovat tzv. smíšenou infekce, při níž je přítomna episomální i integrovaná forma HPV. Je tedy pravděpodobné, že integrovaná forma HPV16 se vyskytuje ve více než námi detekovaných 50 % HPV16 pozitivních vzorků. Všechny HPV18 pozitivní vzorky obsahovaly integrovanou formu HPV (Badaracco et al., 2002; Kristiansen et al., 1994). U 79 % vzorků byla nalezena HPV16 a/nebo HPV18 infekce. 75 % patientských vzorků bylo HPV16 pozitivních, 17 % HPV18 pozitivních a 12,5 % HPV16 a 18 pozitivních. Ostatní studie uvádí zastoupení HPV16 infekce u 50 %, HPV18 u 10 % pacientů a infekce HPV16 a 18 byla popsána u 45 % nádorů cervixu (Badaracco et al., 2002; Bosch et al., 1995).

U některých patientských vzorků jsme pozorovali zvýšenou hladinu DNMTs nejen v jádře, ale i v cytoplasmě (Obr. 37.). Tento jev se vyskytoval za současné jaderné overexpresi dané DNMT i bez ní. Cytoplasmatická lokalizace DNMT1 byla pozorována u isoformy DNMT1o, DNMT1 isoforma exprimovaná pouze v oocytech. Cytoplasmatická lokalizace DNMT1o je pravděpodobně významná pro transkripční aktivaci specifických genů pomocí pasivní demetylace. Další isoforma DNMT1 s cytoplasmatickou lokalizací byla identifikována v diferencovaných myotubách a varlatech, tato forma DNMT1 se nejspíš aktivně podílí na metylaci DNA během diferenciaci a gametogeneze. Obě cytoplasmatické isoformy DNMT1 mají zkrácený N-konec polypeptidového řetězce (Dhe-Paganon et al., 2011). Cytoplasmatická lokalizace DNMT3A a 3B byla popsána při delecii NLS (nuclear localization signal) (Chen et al., 2004). Vysoká cytoplasmatická imunoreaktivita DNMT3A bez jaderné imunoreaktivity byla pozorována v neoplastických hepatocytech a dysplastických uzlinách. Se zvyšujícím se stádiem kancerogeneze cytoplasmatická imunoreaktivita klesala a jaderná rostla. Cytoplasmatická hladina DNMT3A by tedy mohla být použita jako diagnostický doplněk hepatocelulárních karcinomů (Choi et al., 2003). Podobný trend v našem souboru vzorků nebyl patrný, je pravděpodobné, že je aberantní cytoplasmatická pozitivita DNMTs spojena se změnou sekvence DNMTs proteinu.

Prognostický či prediktivní význam cytoplasmatické positivity DNMTs, je-li nějaký, nebyl doposud objasněn.



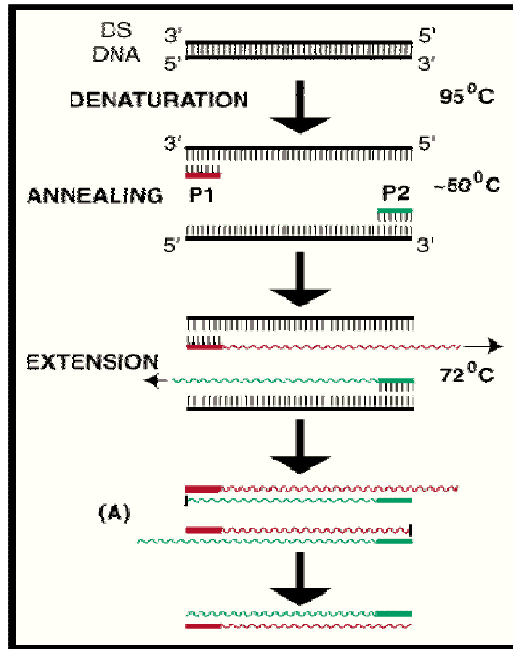
Obr. 37.: Cytoplasmatická imunoreaktivita DNMT3A (a) a DNMT3B (b) v oblasti karcinomu cervixu

Overexpresi EZH2 je spojována s řadou nádorových onemocnění včetně karcinomu cervixu (**Fang et al., 2011**). Všechny analyzované patientské vzorky nádorové tkáně vykazovaly vysokou overexpresi EZH2. EZH2 je prognostickým a /nebo diagnostickým markerem asociovaným s agresivitou nádoru. V HPV16 pozitivních buňkách byla popsána upregulace exprese EZH2 způsobená E7 iniciovaným uvolněním E2F transkripčního faktoru (**Hollandet al., 2008**). Posledním sledovaným epigenetickým regulátorem byl protein WHSC1, jehož overexpresi byla popsána u karcinomu cervixu i v řadě jiných nádorových onemocnění (**Hudlerbush et al., 2011**). Vzorky nádorové tkáně vykazovaly overexpresi WHSC1, exprese však byla v porovnání s proteinem EZH2 výrazně nižší. Míru overexpresi EZH2 a WHSC1 se nám z důvodu nedostatku materiálu nepodařilo analyzovat u většiny množství pacientů, výsledky tedy nelze korelovat s HPV typizací či formou HPV.

2. VÝSKYT HPV INFEKCE V DĚLOŽNÍM EPITELU ODEBRANÉHO ASYMPTOMATICKÝM ŽENÁM STŘEDNÍHO A STARŠÍHO VĚKU

Životní cyklus mnoha virů zahrnuje latentní fázi, kdy je virus v tkáni přítomen v nízkém počtu jen v několika buňkách, replikace genomu a exprese virových proteinů je značně omezena. Latentní virová infekce probíhá bez jakýchkoli příznaků onemocnění. Je velmi pravděpodobné, že i lidské papillomaviry mají latentní fázi infekce. Nasvědčuje tomu i vysoká míra recidivy HPV6 a HPV11 infekce. Latentní papillomavirová infekce byla zatím prokázána pouze na zvířecích modelech. Infekce kůže králíka králičím papillomavirem (CRPV, Cottontail Rabbit Papillomavirus) může vyvolat asymptomatickou infekci. Nízký počet kopií (1 kopie genomu viru na 40 až 1000 buněk, v porovnání s produktivní infekcí 75 kopií genomu viru na buňku) genomu papillomavirů může přetrvávat v epidermálních kmenových buňkách hostitele. Jediným exprimovaným virovým proteinem při latentní infekci je E1, nezbytný pro zachování genomu. Expozice exogenním faktorům jako je UV záření nebo mechanické podráždění, může virus aktivovat (**Gravitt, 2011; Maglennon et al, 2011**). Cílem tohoto projektu bylo identifikovat latentní HPV infekci ve tkáni cervixu odebrané ženám středního a vyššího věku, u nichž se dá předpokládat, že během svého života HPV infekci již prodělaly a u některých se mohla vyvinout latentní HPV infekce. Hlavním cílem je objasnit, zda je latentní HPV infekce přítomna v běžné lidské populaci a může tak iniciovat vývoj karcinomu cervixu u asymptomatických žen. Potvrzení přítomnosti latentní formy HPV by bylo velmi užitečné z hlediska prevence vzniku nádorového onemocnění děložního čípku.

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) je metoda používaná k rychlému zmnožení úseků DNA nacházejících se mezi primery. Na začátku polymerázové reakce DNA denaturuje, na komplementární místa na rozvolněné DNA nasedají primery a za účasti ExoKlenow fragmentu Taq polymerasy se syntetizují komplementární vlákna k DNA (Obr. 9.). Tento proces se opakuje v několika desítkách cyklů (30 a více). PCR je velmi citlivá metoda, je vhodná k detekci i velmi nízkého počtu kopií cílové DNA. PCR reakce s využitím GP5+/GP6+ primerů byla jediná dostatečně citlivá metoda pro detekci méně než 10 kopií HPV.



Obr. 38.: Princip PCR reakce (www.flmnh.ufl.edu)

GP5+/GP6+ primery vznikly prodloužením GP5/GP6 primerů na jejich 3' koncích, což vedlo až k 100násobnému zvýšení citlivosti detekce HPV. GP5+/GP6+ primery jsou specifické pro L1 oblast 23 typů HPV infikujících sliznice. Citlivost testu je v řádech fentogramů pro genotypy, které silně vážou s primery (např. HPV16) a v řádech pikogramů pro genotypy, které se mají 4 a více nepárující se nukleotidy s jedním nebo s oběma primery (např. HPV39) (Tab. 14.) (de Roda Husman et al., 1995).

Tab. 14.: Srovnání sekvence GP5 a GP5+, GP6 a GP6+ se sekvencemi odpovídajícího regionu v L1 ORF 23 genotypů HPV infikujících sliznice (tečky znamenají identické base jako v primeru, znaky odlišnost basí) (de Roda Husman et al., 1995)

	Th rTh rArg	Glu GluTy r Ph e
GP5	5'-TTTGTACTGTGGTAGATAC-3'	GP6 3'-ACTAAATGTCAAATAAAAAG-5'
GP5+	5'-TTTGTACTGTGGTAGATAC TAC-3'	GP6+ 3'-CTTAT ACTAAATGTCAAATAAAAAG-5'
HPV-6B C.. ACGC	HPV-6B CTT ..C.. ..T.....
HPV-II C.. ..	HPV-II ..C ..C.A
HPV-13A..T..... ..	HPV-13A
HPV-16T..T..... ..	HPV-16 ..C
HPV-18 C.. T..	HPV-18 ..C
HPV-30T..G..C.. .. TA.G	HPV-30 ..C
HPV-31 C.. ..T	HPV-31 ..C
HPV-32C..A.....T..G..... .. C..T	HPV-32 ..C
HPV-33 C.. T..	HPV-33G.....C.....
HPV-34T..A.....T..... TA.A	HPV-34C.....GG..C.....C..C.....
HPV-35A..T..... A.. C..T	HPV-35
HPV-39C.....T..G..C..... .. C..T	HPV-39 ..C ..C.....T.....T.....
HPV-40A..T.....C..... C.. T..T	HPV-40 ..C ..C.A
HPV-42T..A.....T..... C.. T..T	HPV-42C.....C.....T.....T.....
HPV-45A..G..C..... .. C..	HPV-45 ..C
HPV-51A.....CTGT..T..... .. CA.A	HPV-51C.....T..C..T.....
HPV-52C..A.....T..G..... C.. T..T	HPV-52 ..C
HPV-53A.....T..G..... C.. CA.G	HPV-53 ..C
HPV-56A..... TA.A	HPV-56 ..C
HPV-58C.....T..... C.. T..T	HPV-58G.....C.....

HPV-61A..C..T..G..... C.. C...	HPV-61	..C ..C.AC..T.....
HPV-66T..G..... .. CA.A	HPV-66	..CTG.....C.C.....
ME180	...C.....T..G..... C.. T...	ME180	..CC..T.....T.....

2.1. Materiál a pomůcky

Multiplex PCR kit (Qiagen), dNTP, ethidium bromid, AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen), buněčná linie SiHa, specifické primery, loading dye 6x (Promega)-fykol, marker 1Kb (Invitrogen), PCR zkumavky, mikrozukavky, špičky, špočky s filtrem, pipety, Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), vortex, termoblok (Techne), chlazená centrifuga (Eppendorf), centrifuga (Fisher Scientific), Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems), elektroforetické vany, zdroj napětí.

2.2. Vzorky patientských tkání

Pracovištěm Walsgrave Hospital v Coventry bylo pro zjištění přítomnosti HPV infekce poskytnuto 59 patientských vzorků tkání pocházejících z hysterktomie, kterou pacientky podstoupily z jiného důvodu než cervikální dysplasie či nnádorového onemocnění, příčinou nebylo onemocnění vyvolané HPV infekcí. Pacientky byly asymptomatické ženy středního a vyššího věku. Vzorek zvolený za vnitřní kontrolu pocházel od pacientky s SCC. Pro experimenty byly použity histologicky ověřené parafinové bloky tkání fixovaných formalínem.

2.3. Složení roztoků

1x TEA	40 mM Tris base; 20 mM kys. octová; 2 mM EDTA; (pH 8)
2,5% agarosový gel	2g agarosy; 100 ml 1x TEA; 10 µl ethidium bromidu

2.4. Použité metody a pracovní postupy

2.4.1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA z tkáně fixované formalínem a zalité v parafinu byl použit AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen). Koncentrace získané DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop™ (čistota DNA bylav rozmezí 1,8 a 2,0). Alikvoty jednotlivých vzorků jsme naředili sterilní vodou na koncentraci 50 ng/µl. Zásobní i naředěné vzorky DNA byly skladovány při teplotě -20°C. Spolu s patientskými vzorky tkáně z cervixu jsme izolovali DNA z krční madle (tonsila), která byla následně použita jako negativní kontrola. DNA izolovaná z buněčných linií byla také neředěna sterilní vodou na koncentraci 20 ng/µl a skladována stejným způsobem jako DNA vzorků.

2.4.2. PCR reakce

Pro zjištění velmi nízkého počtu kopií HPV ve vzorku jsme zvolili GP5+/6+ primery. Před provedením samotného testu na přítomnost HPV jsme provedli test kvality izolované DNA za pomoci PCR reakce, při níž dochází k amplifikaci úseku DNA v oblasti housekeepingového genu pro glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenasu (GAPDH). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tab. 15. GAPDH produkt měl velikost 130bp. Konečná koncentrace FW i RW primeru na reakci byla 0,1 μ M (Oliver et al., 2011). Podmínky reakce a složení PCR mixu jsou uvedeny v Tab. 16. a Tab. 17.

Tab. 15: Sekvence použitých primerů

GAPDH	FW primer	5' -CATTGACCTCAACTACATGGT-3'
	RW primer	5' -TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'
GP5+/GP6+	GP5+	5' -TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3'
	GP6+	5' -GAAAAATAAAGTAAATCATATTC-3'

Tab. 16.: Složení PCR mixu na jednu reakci- GAPDH

	PCR mix
10x PCR pufr	2,5 μ l
MgCl ₂	1,25 μ l
dNTP	0,2 μ l
GAPDH F	0,5 μ l
GAPDH R	0,5 μ l
Taq DNA polymerasa	0,25 μ l
DNA	2 μ l
Voda	5,5 μ l

Tab. 17.: PCR program pro GAPDH

PCR program			35 cyklů
Predenaturace	95°C	1 min.	
Denaturace	95°C	15 s.	
Annealing	55°C	15 s.	
Elongace	72°C	30 s.	
Konečné prodloužení	72°C	7 min.	
Konec	4°C	∞	

Po ověření kvality DNA byl proveden HPV screeningový test za užití GP5+/GP6+ primerů (Tab. 15.). Konečná koncentrace GP5+ i GP6+ primeru ve 25 μ l PCR mixu byla 5pM. Produkt PCR reakce měl velikost 150 bp (de Roda Husman et al., 1995). Podmínky reakce a složení PCR mixů jsou uvedeny v Tab. 18. a Tab. 19.

Tab. 18.: Složení premixu pro jednu reakci, zjištění HPV pozitivitu pomocí GP5+/GP6+

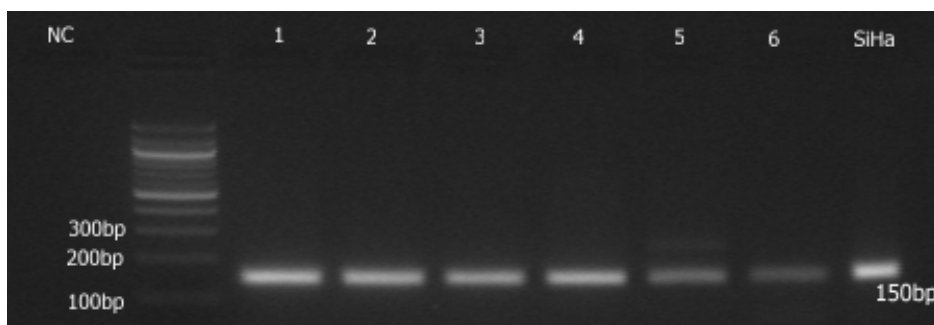
	PCR mix
2x Master mix	12,5 µl
GP5+ primer	1 µl
GP6+ primer	1 µl
Voda	8,5 µl
DNA	2 µl

Tab. 19.: Program pro GP5+/GP6+

PCR program			
Predenaturace	95°C	15 min.	43 cyklů
Denaturace	94°C	1 min.	
Annealing	41°C	2 min.	
Elongace	72°C	1,5 min.	
Konečné prodloužení	72°C	5 min.	
Konec	4°C	∞	

2.5. Výsledky

Před aplikací PCR metody za využití GP5+/GP6+ primerů na patientské vzorky jsme ověřili její citlivost, resp. detekční limit metody. Pro test citlivosti jsme vybrali buněčnou linii SiHa, kterou jsme ředili HPV negativním vzorkem DNA používaným jako negativní kontrola (NC) (Obr. 39.). Byla vytvořena koncentrační řada od 8638 kopií (Obr.39; 1) po 2,75 kopií (Obr.39; 6). Touto metodou jsme schopni detekovat méně než 10 kopií HPV.



Obr. 39.: Test senzitivity PCR metody u koncentrační řady HPV16 pozitivních SiHa ředěných HPV negativním vzorkem zaužití GP5+/GP6+ primerů

NC- negativní kontrola, 1- 8636 kopií HPV16, 2- 1727kopií HPV16, 3-345 kopií HPV16, 4-69 kopií HPV16, 5-14 kopií HPV16, 6- 2,75 kopií HPV16, SiHa

Vhodná kvalita a koncentrace DNA všech vzorků byla ověřena za pomoci PCR reakce detekující GAPDH. Všechny 59 vzorků pocházelo z hysterektomie, kterou pacientky nepodstoupily z důvodu neoplastických změn (histologicky ověřeno). Věk patientek se

pohyboval od 35 do 80 let. DNA všech vzorků byla dostatečně kvalitní, GAPDH bylo detekováno u všech 59 vzorků. PCR detekci latentní formy HPV viru jsme aplikovali na 59 patientských vzorků. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek pacientky s mikroinvazivním SCC s dříve potvrzenou HPV infekcí. Všechny 59 analyzovaných vzorků bylo HPV negativní, nevykazovalo tedy žádnou přítomnost latentního HPV viru.

2.6. Diskuse

V našem souboru 59 patientských vzorků pocházejících od asymptomatických žen středního a vyššího věku se nepodařilo detekovat latentní HPV infekci (více než 3 kopií HPV na 40 ng DNA izolované z cervikálního epitelu).

V námi analyzované skupině pacientů nebyla potvrzena přítomnost latentní (ani jiné) formy HPV viru. Vzhledem k malému počtu analyzovaných pacientů nelze s jistotou tvrdit, že se latentní HPV infekce v lidské populaci nevyskytuje. Výsledek musí být verifikován na větším souboru pacientů. Tato práce je jedním z prvních výzkumů zabývajících přímo přítomností latentní formy HPV infekce v epitelu cervikální sliznice, naprostá většina studií se zabývá pouze přítomností produktivní HPV infekce charakterizované vysokým počtem kopií genomu HPV např. **de Sanjosé, 2007**. Dosud provedené studie zabývající se existencí HPV latence se zaměřovaly na populace žen, které prodělaly HPV infekci, a po určité době bez známek infekce u nich byl HPV opět detekován. Opakovanou HPV pozitivitu oddělenou intervalem HPV negativity může způsobit reinfekce nebo reaktivace latentní infekce. Některé studie se zabývaly skupinami sexuálně abstinujících žen, u nichž byl vliv nových sexuálních partnerů omezen, ale pravděpodobně ne zcela eliminován. 60 % sexuálně abstinujících žen zůstalo negativních, ale ženy s alespoň jedním novým sexuálním partnerem byly ze 70 % nově HPV pozitivní (**Trottier et al., 2010**). Pro studium HPV infekce dosud nebyly použity vzorky asymptomatických žen, v jejichž tkáni by se mohl nacházet latentní virus. V publikovaných případech pocházely vzorky z biopsií od žen s premaligními či maligními změnami cervixu. Během potenciální latentní fáze byly odebírány pouze stěry ze sliznice s odumřelými epitelálními buňkami, které nijak nevypovídají o možné přítomnosti nízkého počtu kopií HPV (latentní infekce) ve spodních vrstvách epitelu sliznice (**de Sanjosé, 2007; González et al., 2010; Muñoz et al., 2004; Stricker et al., 2005; Trottier et al., 2010**). Existence latentní fáze HPV a jeho následná reaktivace by vysvětlovaly druhý pík HPV prevalence u starších žen (viz. Úvod). Názory na příčinu zvýšené prevalence HPV infekce u starších žen se různí. Většina studií popisuje jako hlavní příčinu pozdní HPV infekce změnu sexuálního chování starších žen (silná asociace mezi novými sexuálními partnery a HPV incidencí). Reaktivace HPV infekce u starších žen s novým sexuálním partnerem je nepravděpodobná, nový sexuální partner není rizikovým faktorem pro reaktivaci HPV

infekce (**de Sanjosé, 2007; González et al., 2010; Trottier et al., 2010**). Naopak růst incidence HPV u žen se stoupajícím počtem sexuálních partnerů teorii reaktivace latentní infekce nevylučuje. Dalším faktorem zvyšujícím prevalenci HPV je snížená imunitní opověď *in vitro* na VLP HPV nebo mitogeny (**de Sanjosé, 2007; Muñoz et al., 2004**). Nejpřesvědčivější informace o existenci HPV latence pocházejí ze studií na HIV pozitivních pacientech. **Stricker et al.** detekoval novou HPV infekci u pacientů po 18 měsíční sexuální abstinenci, výskyt nové HPV infekce byl u HIV pozitivních pacientek vyšší než u HIV negativních. Akutní HIV infekce vede k velkému úbytku paměťových T-lymfocytů ve sliznici, což může vést k přechodu latentní HPV infekce v produktivní infekci. Imunitní systém má klíčovou roli v zachování papillomavirové infekce v klidovém stádiu. Vnější faktory jako poranění epitelu, hladiny hormonů nebo imunosuprese mohou vést k reaktivaci infekce (**Maglennon et al., 2011**).

Studie zabývající se latentní HPV infekcí by se měly zaměřit výhradně na detekci latentního HPV v epitelu cervixu asymptomatických žen a potvrdit či vyvrátit pravdivost modelů HPV infekce vytvořených na základě zvířecích modelů (COPV, CRPV). Veškeré dosud získané důkazy o existenci latentní fáze onkogenních lidských papillomavirů jsou pouze nepřímé. Cílem tohoto projektu bylo detekovat nízký počet kopií HPV genomu v epitelu cervikální sliznice asymptomatických pacientek, s normálním cytologickým obrazem. U žen středního a vyššího věku se dá předpokládat, že během svého života prodělaly HPV infekci, která následně mohla přejít v latentní infekci. U žádného z 59 analyzovaných vzorků nebyl HPV virus detekován. Soubor pacientů bude rozšířen a výzkum HPV latence bude dále probíhat. Předpokládáme, že budou nalezeni HPV pozitivní pacientky, jež budou selektováni podle positivity E4 proteinu na pacienty s latentní formou infekce (E4 negativní) a produktivní infekcí (E4 pozitivní).

2.7. Závěr

Ze souboru 65 patientských tkání bylo vybráno 23, u nichž byla nalezena přítomnost CIN3 a/nebo cervikálního karcinomu. U těchto tkání byla vyšetřena přítomnost HPV16/18 infekce (HPV16/18 typizace) a forma výskytu HPV viru (test E2 disrupce). Byla optimalizována imunohistochemická detekce exprese DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 a WHSC1. Patientské vzorky s prekancerotickými a/nebo kancerózními změnami cervikální tkáně byly vyšetřeny na všechny studované markery. U všech epigenetických regulátorů byla pozorována overexprese v CIN3 i nádorové tkáni. Vzhledem k nedostatečnému počtu vyšetřených pacientů nebyl nalezen významný rozdíl mezi expresí v CIN3 či nádorové tkáni. Nicméně, overexprese DNMT1 a DNMT3B byla vyšší u integrované formy HPV16 v porovnání s pacienty s episomální formou HPV16, což patrně souvisí s agresivitou nádoru. Pro potvrzení důležitosti nalezených změn je třeba provést analýzy na rozšířeném souboru pacientů. Další výzkum by měl odhalit asociaci míry exprese jednotlivých epigenetických regulátorů s agresivitou nádoru či odpovědí na léčbu a metylačním statutem vybraných genů.

V druhém projektu jsme se snažili prokázat existenci latentní fáze životního cyklu HPV napadajících genitálie. Latentní virus by se měl podle výzkumů provedených na zvířecích modelech nacházet v buňkách bazální vrstvy epitelu a to pouze v nízkém počtu kopií. Žádný z 59 patientských vzorků odebraných asymptomatickým ženám středního a vyššího věku nebyl HPV pozitivní. Lze tedy soudit, že se latentní forma genitálních HPV se v lidské populaci nevyskytuje. Nicméně, jedná se pouze o pilotní studii na velmi malém souboru pacientů, pro ověření pravdivosti výsledku tohoto projektu je třeba otestovat větší soubor patientských vzorků. Přítomnost latentní infekce by mohla zásadně ovlivnit časnou diagnostiku a tím prognózu pacientek s cervikálním karcinomem. Studium životního cyklu HPV a jeho vlivu na epigenetickou regulaci exprese buněčných genů je nezbytný pro porozumění HPV indukované kancerogeneze, pro nádorovou diagnostiku a vývoj nových strategií léčby karcinomu cervixu.

VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbate E. A., Berger J. M., Botchan M. R. (2004) The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2, *Genes & Dev* **18**, 1981-1996.

Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J., a kolektiv (2003) *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, pp. 258-266, Grada Publishing a.s., Praha, ČR.

Adams M. Jasani B., Fiander A.(2009) Prophylactic HPV vaccination for women over 18 years of age. *Vaccine*. **27**, 3391-4.

Albert M., Helin K.(2010) Histone methyltransferases in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. **21**, 209-20.

Au Yeung C. L., Tsang W. P., Tsang T. Y., Co N. N., Yau P. L., Kwok T. T.(2010) HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53, *Oncol Rep*. **24**,1599-604.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) *Molecular biology of the cell*, 5th ed., pp. 446, 467-477, Garland Science, NY, USA.

Badaracco G., Venuti A., Sedati A., Marcante M. L. (2002) HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness, *J Med Virol*. **67**, 574-82.

Bernard H. U. (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses, *J Clin Virol*. **32**, Suppl 1:S1-6.

Bosch F. X., Manos M. M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A. M., Peto J., Schiffman M. H., Moreno V., Kurman R., Shah K. V.(1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective, *J Natl Cancer Inst*. **87**, 796-802.

Brunell A. P. (2007) Direct marketing of vaccines to state legislators raises questions, *INFECTIOUS DISEASE NEWS*, <http://www.infectiousdiseaseneeds.com/view.aspx?rID=37034>

Chen T., Tsujimoto N., Li E.(2004) The PWWP domain of Dnmt3a and Dnmt3b is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin, *Mol Cell Biol.* **24**, 9048-58.

Choi M. S., Shim Y. H., Hwa J. Y., Lee S. K., Ro J. Y., Kim J. S., Yu E.(2003) Expression of DNA methyltransferases in multistep hepatocarcinogenesis, *Hum Pathol.* **34**, 11-7.

Collins S. I., Constandinou-Williams C., Wen K., Young L. S., Roberts S., Murray P. G., Woodman C. B. (2009) Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study, *Cancer Res.* **69**, 3828-32.

Darnell G. A., Schroder W. A, Antalis T. M., Lambley E., Major L., Gardner J., Birrell G., Cid-Arregui A., Suhrbier A. (2007) Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein, *J Biol Chem.* **282**, 37492-500.

Das P. M., Singal R. (2004) DNA methylation and cancer, *J Clin Oncol.* **22**, 4632-42.

Davy C. E., Jackson D. J., Raj K., Peh W. L., Southern S. A., Das P., Sorathia R., Laskey P., Middleton K., Nakahara T., Wang Q., Masterson P. J., Lambert P. F., Cuthill S., Millar J. B., Doorbar J. (2005) Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes, *J Virol.* **79**, 3998-4011.

Deacon J. M., Evans C. D., Yule R., Desai M., Binns W., Taylor C., Peto J. (2000) Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort, *Br J Cancer.* **83**, 1565-72.

Delage B., Dashwood R. H.(2008) Dietary manipulation of histone structure and function. *Annu Rev Nutr.* **28**, 347-66.

de Roda Husman A. M., Walboomers J. M., van den Brule A. J., Meijer C. J., Snijders P. J. (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR, *J Gen Virol.* **76**, 1057-62.

- de Sanjosé S., Diaz M., Castellsagué X., Clifford G., Bruni L., Muñoz N., Bosch F. X (2007) Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis, *Lancet Infect Dis.* **7**, 453-9.
- de Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., zur Hausen H. (2004) Classification of papillomaviruses, *Virology* **324**, 17-27.
- DeVita T., Lawrence Jr. T. S., Rosenberg S. A. (2008) Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology, 8th ed., Vol. 1, pp. 55-64, 79-91, 182-4, 315, 552, 553, 990, 1493-1521.
- Dhe-Paganon S., Syeda F., Park L. (2011) DNA methyl transferase 1: regulatory mechanisms and implications in health and disease, *Int J Biochem Mol Biol.* **2**, 58-66.
- Dong S. M., Kim H. S., Rha S. H., Sidransky D. (2001) Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix, *Clin Cancer Res.* **7**, 1982-6.
- Doorbar J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clinical Science* **110**, 525-541.
- Doorbar J., Foo C., Coleman N., Medcalf L., Hartley O., Prospero T., Napthine S., Sterling J., Winter G., Griffin H. (1997) Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4, *Virology.* **238**, 40-52.
- Duensing S., Münger K. (2004) Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins, *Int J Cancer.* **109**, 157-62.
- Fang J., Zhang M., Li Q. (2011) **Enhancer** of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and invasion in cervical cancer, *Am J Med Sci.* **342**, 198-204.
- Favre M., Breitburd F., Croissant O., Orth G. (1977) Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses, *J Virol.* **21**, 1205-9.
- Ganguly N., Parihar S. P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis, *J. Biosci.* **34**, 113-123.
- Giuliano A. R., Lazcano-Ponce E., Villa L. L., Flores R., Salmeron J., Lee J. H, Papenfuss M. R., Abrahamsen M., Jolles E., Nielson C. M., Baggio M. L., Silva R., Quiterio M. (2008) The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence

and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **8**,2036-43.

González P., Hildesheim A., Rodríguez A. C., Schiffman M., Porras C., Wacholder S., Piñeres A. G., Pinto L. A., Burk R. D., Herrero R.(2010) Behavioral/lifestyle and immunologic factors associated with HPV infection among women older than 45 years, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **19**, 3044-54.

Gravitt P. E. (2011) The known unknowns of HPV natural history, *J Clin Invest.* **121**, 4593-9.

Hayes S.(2006) Pathways to silencing unite, *Nat Cell Biol.* **8**, 315.

Hindmarsh P. L., Laimins L. A.(2007) Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry, *Virology* **4**,19.

Holland D., Hoppe-Seyler K., Schuller B., Lohrey C., Maroldt J., Dürst M., Hoppe-Seyler F. (2008) Activation of the enhancer of zeste homologue 2 gene by the human papillomavirus E7 oncoprotein, *Cancer Res.* **68**, 9964-72.

<http://akramania.byethost11.com/Robbins/274.html@printing=true.htm>

<http://www.arhp.org/publications-and-resources/clinical-proceedings/Managing-HPV/Prevention>

<http://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2153>

<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>

<http://www.leinco.com/immunohistochemistry>

<http://www.lesc.ic.ac.uk/projects/appp.html>

<http://www.mayoclinic.com/health/medical/IM01875>

<http://www.svod.cz>

Hudelist G., Manavi M., Pischinger K. I., Watkins-Riedel T., Singer C. F., Kubista E., Czerwenka K. F.(2004) Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade, *Gynecol Oncol.* **92**, 873-80.

Hudlebusch H. R., Santoni-Rugiu E., Simon R., Ralfkiaer E., Rossing H. H., Johansen J. V., Jørgensen M., Sauter G., Helin K. (2011)The histone methyltransferase and putative oncoprotein MMSET is overexpressed in a large variety of human tumors. *Clin Cancer Res.* **17**, 2919-33.

IARC (2005) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monographs **90**, Lyon. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>

Janeway Ch. A., Jr, Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. (2001) *Immunobiology*, 5th edition, *The Immune System in Health and Disease*, pp. 26-33, Garland Science, NY, USA.

Jeon S., Allen-Hoffmann B. L., Lambert P. F.(1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells., *J Virol.* **69**, 2989-97.

Jeon S., Lambert P. F.(1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 1654-8.

Jung J. W., Lee S., Seo M. S., Park S. B., Kurtz A., Kang S. K., Kang K. S. (2010) Histone deacetylase controls adult stem cell aging by balancing the expression of polycomb genes and jumonji domain containing 3, *Cell Mol Life Sci.* **67**, 1165-76.

Kim J. J. (2010) Targeted human papillomavirus vaccination of men who have sex with men in the USA: a cost-effectiveness modelling analysis, *Lancet Infect Dis.* **10**, 845-52.

Kolářová H., Dörr A.: Screening karcinomu děložního hrdla v České republice, 2005 XXIX. Brněnské onkologické dny a XIX. Konference pro sestry a laboranty, číslo abstraktu: 027.

Kolařík D., Halaška M., Feyereisl J. (2008) *Repetitorium gynekologie*, pp. 718-725, MAXDORF s.r.o., Praha, ČR.

Kristiansen E., Jenkins A., Holm R. (1994) Coexistence of episomal and integrated HPV16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix, *J Clin Pathol.* **47**, 253-6.

Le Bon A., Tough D. F. (2002) Links between innate and adaptive immunity via type I interferon, *Curr Opin Immunol.* **14**, 432-6.

Letian T., Tianyu Z.(2010) Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus , *Virology.* **7**, 2.

Lowe J., Panda D., Rose S., Jensen T., Hughes W. A., Tso F.Y., Angeletti P.C.(2008) Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1, *Virology.* **5**, 150.

Lu Z., Hu X., Li Y., Zheng L., Zhou Y., Jiang H., Ning T., Basang Z., Zhang C., Ke Y. (2004) Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberin, *J Biol Chem.* **279**, 35664-70.

Mack G. S. (2010) To selectivity and beyond, *Nat Biotechnol.* **28**, 1259-66.

Luczak M. W., Roszak A., Pawlik P., Kędzia H., Kędzia W., Malkowska-Walczak B., Lianeri M., Jagodziński P. P. (2011) Transcriptional analysis of CXCR4, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 gene expression in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Int J Oncol.* **40**, 860-6.

Maglennon G. A., McIntosh P., Doorbar J.(2011) Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression, *Virology.* **414**,153-63.

Májek, O., Dvořák, V., Dušek, L., Mužík, J., Šnajdrová, L., Gregor, J.(2012) Cervix.cz – Cervical Cancer Screening Programme in the Czech Republic, Masaryk university, Brno, <http://www.cervix.cz>. ISSN

Matthews K., Leong C. M., Baxter L., Inglis E., Yun K., Bäckström B. T., Doorbar J., Hibma M. (2003) Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin, *J Virol.* **77**, 8378-85.

Margueron R., Reinberg D.(2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life, *Nature*. **469**, 343-9.

McIntosh P. B., Laskey P., Sullivan K., Davy C., Wang Q., Jackson D. J., Griffin H. M., Doorbar J. (2010) E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium, *J Cell Sci*. **123**, 2810-22.

Meehan R. R.(2003) DNA methylation in animal development, *Semin Cell Dev Biol*. **14**, 53-65.

Melkert P. W., Hopman E., van den Brule A. J., Risse E. K., van Diest P. J., Bleker O. P., Helmerhorst T., Schipper M. E., Meijer C. J., Walboomers J. M. (1993) Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent., *Int J Cancer* **53**, 919–923.

Mendez F., Munoz N., Posso H., Molano M., Moreno V., van den Brule A. J., Ronderos M., Meijer C., Munoz A; Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines, *J Infect Dis*. **192**, 1158-65.

Middleton K., Peh W., Southern S., Griffin H., Sotlar K., Nakahara T., El-Sherif A., Morris L., Seth R., Hibma M., Jenkins D., Lambert P., Coleman N., Doorbar J. (2003) Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers, *J Virol*. **77**, 10186-201.

Morey L., Helin K.(2010) Polycomb group protein-mediated repression of transcription, *Trends Biochem Sci*. **35**, 323-32.

Morishita M., di Luccio E.(2011) Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases, *Biochim Biophys Acta*. **1816**, 158-63.

Müller J., Kassis J. A. (2006) Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **16**, 476–484.

Münger K., Basile J. R., Duensing S., Eichten A., Gonzalez S. L., Grace M., Zacny V. L. (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein, *Oncogene*. **20**, 7888-98.

Muñoz N., Bosch F. X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K. V., Snijders P. J., Meijer C. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *JN Engl J Med.* **348**, 518-27.

Muñoz N., Méndez F., Posso H., Molano M., van den Brule A. J., Ronderos M., Meijer C., Muñoz A. (2004) Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results, *J Infect Dis.* **190**, 2077-87.

Narayan G., Arias-Pulido H., Koul S., Vargas H., Zhang F. F., Vilella J., Schneider A., Terry M. B., Mansukhani M., Murty V. V. (2003) Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome, *Mol Cancer.* **2**, 24.

Narayan G., Goparaju C., Arias-Pulido H., Kaufmann A. M., Schneider A., Dürst M., Mansukhani M., Pothuri B., Murty V. V. (2006) Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression., *Mol Cancer.* **5**, 16.

Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development, *Cell.* **99**, 247-57.

Oliver A. W., He X., Borthwick K., Donne A. J., Hampson L., Hampson I. N. (2011) The HPV16 E6 binding protein Tip-1 interacts with ARHGEF16, which activates Cdc42. *Br J Cancer.* **104**, 324-31.

Petráš M. (2011) HPV proočkovanoct v ČR, www.vakciny.net/AKTUALITY/akt_2011_12.htm

Petráš M. (2011) Plošné HPV očkování v ČR, www.vakciny.net/AKTUALITY/akt_2011_23.htm

Patráš M. (2012) Očkování proti lidským papillomavirů (HPV), http://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/HPV.html#TOP

Ramoz N., Rueda L. A., Bouadjar B., Montoya L. S., Orth G., Favre M. (2002) Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis, *Nature Genetics* **32**, 579 – 581.

Roztočil A., Báča V., Bartoš P., Cvrček P., Čepický P., Doucková P., Dvořák D., Feyereisl J., Hlaváčová L., Hořín P., Hořínová V., Kepák J., Krofta L., Kečera M., Líbalová Z., Peschout R., Roztočilová S., Řežábek K., Skovajsová M., Slavíček L., Šafář P., Šimetka O., Valová A., Zavadil M. (2011) *Moderní gynekologie*, pp. 336- 343, GRADA Publishing, Praha, ČR.

Sawada M., Kanai .Y, Arai E., Ushijima S., Ojima H., Hirohashi S. (2007) Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion, *Cancer Lett.* **251**, 211-9.

Sheinfeld Gorin S. N., Glenn B. A., Perkins R. B. (2011) The human papillomavirus (HPV) vaccine and cervical cancer: uptake and next steps, *Adv Ther.* **28**, 615-39.

Schwarz E., Dürst M., Demankowski C., Lattermann O., Zech R., Wolfspurger E., Suhai S., zur Hausen H. (1983) DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b., *EMBO J.* **2**, 2341–2348.

Smetana, J., Boštková, V., Boštík, P., Chlábek, R. (2011) HPV infekce, cervikální karcinom a vakcinace; <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/hpv-infekce-cervikalni-karcinom-a-vakcinace-462091>

Stanley M. A., Pett M. R., Coleman N. (2007) HPV: from infection to cancer, *Biochem Soc Trans.* **35**, 1456-60.

Strickler H. D., Burk R. D., Fazzari M., Anastos K., Minkoff H., Massad L. S., Hall C., Bacon M., Levine A. M., Watts D. H., Silverberg M. J., Xue X., Schlecht N. F., Melnick S., Palefsky J. M. (2005) Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women, *J Natl Cancer Inst.* **97**, 577-86.

Trottier H., Ferreira S., Thomann P., Costa M. C., Sobrinho J. S., Prado J. C., Rohan T. E., Villa L. L., Franco E. L. (2010) Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity, *Cancer Res.* **70**, 8569-77.

Taira A. V., Neukermans C. P., Sanders G. D.(2004) Evaluating human papillomavirus vaccination programs, *Emerg Infect Dis.* **10**, 1915-23.

Verteramo R., Pierangeli A., Mancini E., Calzolari E., Bucci M., Osborn J., Nicosia R., Chiarini F., Antonelli G., Degener A. M.(2009) Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients, *BMC Infect Dis.* **9**,16.

Vinther J., Rosenstjerne M. W., Kristiansen K., Norrild B. (2005) The 3' region of human papillomavirus type 16 early mRNAs decrease expression. *BMC Infect Dis.* **5**, 83.

Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., Bosch F. X., Kummer J. A., Shah K. V., Snijders P. J., Peto J., Meijer C. J., Muñoz N.(1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol.* **189**, 12-9.

Widschwendter A., Gatringer C., Ivarsson L., Fiegl H., Schneitter A., Ramoni A., Müller H. M., Wiedemair A., Jerabek S., Müller-Holzner E., Goebel G., Marth C., Widschwendter M.(2004) Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervicovaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. *Clin Cancer Res.* **10**, 3396-400.

Weaver B. A. (2006) Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection, *J Am Osteopath Assoc.* **106**, S2-8.

Wei, J (2009) Pathology of Cervical Carcinoma, *Glob. libr. women's med.*, http://www.glowm.com/?p=glowm.cml/section_view&articleid=230.

Woodman C. B., Collins S. I., Young L. S.(2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues, *Nat Rev Cancer.* **7**, 11-22.

Wu X., Gong Y., Yue J., Qiang B., Yuan J., Peng X.(2008) Cooperation between EZH2, NSPc1-mediated histone H2A ubiquitination and Dnmt1 in HOX gene silencing, *Nucleic Acids Res.* **36**, 3590-9.

Yu T., Ferber M. J., Cheung T. H., Chung T. K., Wong Y. F., Smith D. I. (2005) The role of viral integration in the development of cervical cancer, *Cancer Genet Cytogenet.* **158**, 27-34.

Yugawa T, Kiyono T. (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins, *Rev Med Virol.* **19**, 97-113.

Zhang B., Spandau D. F., Roman A. (2002) E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis, *J Virol.* **76**, 220-31.

Zhang B., Li P., Wang E., Brahmi Z., Dunn K. W., Blum J. S., Roman A. (2003) The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma, *Virology.* **310**, 100-8.

Zheng Z. M., Baker C. C. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation, *Front Biosci.* **1**, 2286-302.

VIII. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADA3	adenosin deaminasa 3; tvoří komplex modulující transkripci a je součástí HAT komplexů
ADD	PHD podobná doména interagující s Lys nemetylovaných histonů
APC	„Adenomatous polyposis coli“; tumorsupresor
Bak	„Bcl-2 homologous antagonist/killer“; proapoptotický protein
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“; proapoptotický protein
bp	„base pairs“; počet nukleotidových párů
BRCA1	„Breast cancer 1“; tumorsupresor podílící se na opravách DNA
BMI1	„Polycomb ring finger oncogene“
c-Myc	transkripční faktor; protoonkogen; váže se do E-boxu a interaguje s HATs
CBP	„CREB-binding protein“; transkripční koaktivátor
CBX4	„Chromobox homolog 4“; nehistonový chromatinový CpG protein s E3 SUMO-protein ligasovou aktivitou
CDC25A	„Cell division cycle 25 homolog A“; fosfatasa nezbytná pro aktivaci CDK4 a CDK2; reguluje přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu
CDK	„Cyclin dependent kinase“; Ser/Thr protein kinasa; regulátor buněčného cyklu
CDK4	„Cyclin dependent kinase 4“; Ser/Thr protein kinasa
CDK6	„Cyclin dependent kinase 6“; Ser/Thr protein kinasa
CFS	„Common fragile site“; oblast častých DNA zlomů
CGIN	„Cervical glandular intraepithelial neoplasia“
CIN	„Cervical intraepithelial neoplasia“; EC: 3
CIN1	lehká dysplasie cervikálního epitelu; EC: 3
CIN2	střední dysplasie cervikálního epitelu; EC: 3
CIN3	těžká dysplasie cervikálního epitelu; EC: 3
CIS	„Carcinoma <i>in situ</i> “
COPV	„Canine Oral Papillomavirus“
CRPV	„Cottontail Rabbit Papillomavirus“
DAB	diaminobenzidin
DNMT	„DNA methyltransferase“; transportují metylovou skupinu ze SAM na cytosin v pozici 5'; EC: 3.3.1.
DNMT1	udržovací DNA methyltransferasa; EC: 3.3.1.
DNMT3A	<i>de novo</i> DNA methyltransferasa; EC: 3.3.1.
DNMT3B	<i>de novo</i> DNA methyltransferasa; EC: 3.3.1.

DNMT3L	enzymaticky neaktivní DNMT; stabilizuje DNMT3A
DPX	„distyren/plasticizer/xylen“; montážní médium ze syntetické pryskyřice
E1	časný protein HPV; nezbytný pro replikaci HPV genomu; EC: 2.1.1.
E2	časný protein HPV; reguluje replikaci a transkripci viru; EC: 2.1.1.
E2F	transkripční faktor interagující s pRB; reguluje G1/S checkpoint buněčného cyklu
E2F1	transkripční faktor interagující s pRB; reguluje G1/S checkpoint buněčného cyklu
E4	E1 ^{E4} bicistronní transkript HPV; uplatňuje se při uvolnění virionů z buňky; EC: 2.1.3.
E5	časný HPV protein; snižuje úroveň degradace EGFR; EC: 2.1.3.
E6	časný HPV onkoprotein; inaktivuje p53; EC: 2.1.2.
E6AP	E6 asociovaný protein; E3a ubiquitin-protein ligasa
E7	časný HPV onkoprotein; inaktivuje pR; EC: 2.1.2.
EDTA	kyselina ehyldiamintetraoctová
EED	„Embryonic ectoderm development“; PcG protein
EGFR	„Epidermal growth factor receptor“; dimerní tyrosinkinasový receptor; aktivuje MAP kinasovou signální dráhu
EV	„Epidermodysplasia verruciformis“; geneticky podmíněné kožní onemocnění zvyšující citlivost pacienta na HPV5 a 8
ER	endoplasmatické retikulum
EZH2	„Enhancer of zeste homolog 2“; histon N-lysin metyltransferasa, součást PRC2; EC: 3.3.2.
FACT	„Facilitates chromatin transcription“; heterodimerický proteinový komplex usnadňující elongaci při transkripci; ovlivňuje RNA polymerasu II
FHIT	„Fragile histidine triad protein“; diadenosin 5',5'''- P1,P3-trifosfát hydrolasa; tumorsupresorový protein
FRA3B	CFS nacházející se v blízkosti genu pro tumorsupresor FHIT; (3p14.2)
FRA8C	CFS nacházející se v blízkosti genu pro protoonkogen c-Myc; (8q24.1)
FRA8D	CFS nacházející se v blízkosti genu pro protoonkogen c-Myc; (8q24.3)
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa; enzym glykolýzy
H-E	Barvení hematoxylinem- eosinem
HAT	histon acyltransferasa
HAUSP	„Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease“; antagonist Mdm2

HDAC	histon deacetylasa
hDLG	„Human disk large homolog 1“, protein s DPZ doménou, interaguje s HPV E6 proteinem
HIC1	„Hypermethylated in cancer 1 protein“, tumorsupresor
HIV	„Human immunodeficiency virus“, virus způsobující progresivní selhání imunitního systému, napadá CD4+ T-lymfocyty
HMT	histon metyltransferasa
<i>hox</i>	homeotické geny jsou významné pro ontogenetický (embryonální) vývoj mnohobuněčných organismů
<i>HOTAIR</i>	„HOX antisense integenic RNA“, ncRNA navádějící PRC2 na cílovou sekvenci při umlčení <i>hoxd</i> klastru genů
HP1	„Histone-binding protein 1“
HPV	„Human papillomavirus“, lidský papillomavirus
HPV16E	Episomální forma HPV16
HPV16I	Integrovaná forma HPV16
hRas	„Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog“, GTPasa; součást signální dráhy aktivované růstovým faktorem
hrHPV	high- risk HPV; kancerogenní lidský papillomavirus
HRPO	„Horseradish peroxidase“, křenová peroxidasa
hScribble	„Human Scribbled homolog“, protein s PDZ doménou; interaguje s E6
hTERT	„Human telomerase reverse transcriptase“, katalytická podjednotka enzymu telomerasy
HSIL	„High -grade squamous intraepithelial lesion“, EC: 3
IFN- α	„Interferon-alfa“, pyrogení faktor
IFN- β	„Interferon-beta“, antivirová aktivita
IFN- γ	„Interferon-gama“, dimerní cytokin
Ii	invariantní řetězec; chaperon MHC třídy II
IGF-2	„Insulin-like growth factor 2“, hormon strukturně podobný insulinu, podporuje růst během těhotenství
IHC	imunohistochemie
IRF-3	„Interferon regulatory factor 3“, aktivátor transkripce IFN- α a β a dalších interferony indukovaných genů
JAK-STAT	přenašeč signálu z extracelulárního prostoru do buňky složený z receptoru; „Janus kinase“ (JAK) a „Signal Transducer and Activator of Transcription“ (STAT)
JARID	„Lysine-specific demethylase“, histon demetylasa

JMJD3	„Lysine-specific demethylase“; histon demethylasa
L1	pozdní HPV protein; majoritní kapsidový protein; EC: 2.1.4.
L2	pozdní HPV protein; minoritní kapsidový protein; EC: 2.1.4.
LB	Langerharsovy buňky; profesionální antigenprezentující buňky dlaždicového epitelu
LDR	„Low-dose rate“; brachyradioterapie s nízkou dávkou radiace
LCR	„long control region“; dlouhá nekódující oblast obsahující ORI a vazebná místa řady transkripčních faktorů
lrHPV	low-risk HPV; lidský papillomavirus způsobující bradavice a benigní léze
LSD1	„Lysine-specific histone demethylase 1“
LSD2	„Lysine-specific histone demethylase 2“
LSIL	„Low-grade squamous intraepithelial lesion“; EC: 3.
MAGI-1	„Membrane-associated guanylate kinase“, protein s PDZ doménou, interaguje s E6
Mdm2	E3 ubiquitin ligasa, negativní regulátor tumorsupresoru p53
MeCP	„Methyl-CpG-binding protein“, vazbou na metylované CpG ireprimují transkripci
MGMT	„O ⁶ -methylguanine DNA methyltransferase“; opravuje O ⁶ -methylguanine kancerogenních lézí DNA způsobených alkylačními mutageny
MHC	„Major histocompatibility complex“, komplexy sprostředkovávající interakci leukocytů
MUPP-1	„Multiple PDZ domain protein“, protein s DPZ doménou, interaguje s E6
NC	negativní kontrola
ncRNA	„Non-coding RNA“
NFX1-91	„Nuclear transcription factor X-box binding 1“, represor promotoru genu pro hTERT
Notch	transmembránový protein s EGF opakováním, účastní se intercelulární komunikace buněk
NSD	„Nuclear receptor binding SET domain“; histon lysin N-metyl transferasa; EC: 3.3.3.
NSD1	„Nuclear receptor binding SET domain 1“; histon lysin N-metyl transferasa; EC: 3.3.3.
NSD2	„Nuclear receptor binding SET domain 2“; MMSET; WHSC1; histon

	lysin N-metyl transferasa; EC: 3.3.3.
NSD3	„Nuclear receptor binding SET domain 3“; WHSC1L1; histon lysin N-metyl transferasa; EC: 3.3.3.
p14ARF	produkt alternativního čtecího rámce genu pro CDKN2A, inhibitor mdm2 (inhibitor p53), reguluje buněčný cyklus
p15 ^{INK4b}	CDKN2B; „Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B“; inhibuje CDK4/6
p16 ^{INK4A}	CDKN2A; „Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A“; inhibuje CDK4/6
p21 ^{WAF1/CIP1}	„Cyclin-dependent kinase inhibitor 1“; jeho exprese je regulována p53; reguluje G1/S checkpoint buněčného cyklu
p27	DDKN1B; „Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B“; brání aktivaci CDK nezbytných pro průchod buňky G1 fází buněčného cyklu
p38	„p38 mitogen-activated protein kinases“; MAP kinasa podílí se na signální kaskádě aktivované cytokiny a buněčným stresem
p53	transkripční faktor, tumorsupresorový protein, reguluje G1/S checkpoint buněčného cyklu
p97	časný promotor HPV
p107	RBLP1; „Retinoblastoma-like protein 1“, tumorsupresor
p130	RBLP2; „Retinoblastoma-like protein 2“, tumorsupresor
p300	transkripční koaktivátor, inaktivovaný E6
p670	pozdní promotor HPV
PAE	časné polyadenylační místo HPV genomu
PAL	pozdní polyadenylační místo HPV genomu
PBS	„Sodium perborate buffer“
PcG	„Polycomb-group family“, PcG proteiny se účastní remodelace chromatinu, epigenetického umlčování genů; EC: 3.3.2.
PCNA	„Proliferating cell nuclear antigen“, faktor proceivity δ DNA polymerasy
PDZ	strukturní doména transmembránových proteinů nezbytná pro intrakci s cytoskeletem a pro tvorbu signálních komplexů
PHD	„Plant homeo domain“; doména interagující s Lys metylovanými histony
PML	„Promyeloic leucemia protein“; transkripční faktor a tumorsupresor
PML-RARα	„Promyeloic leucemia protein“- „Retinoic acid receptor α“; fúzní protein charakteristický pro akutní promyeloidní leukémii; PML je transkripční faktor a tumorsupresor; RARα je jaderný receptor aktivovaný retinoovou kyselinou s funkcí transkripčního regulátoru

PLZF-RAR α	„Zinc finger and BTB domain-containing protein 16“- „Retinoic acid receptor α “; fúzní protein charakteristický pro akutní promyeloidní leukémii; PLZF je regulátor buněčného cyklu; RAR α je jaderný receptor aktivovaný retinoovou kyselinou s funkcí transkripčního regulátoru
pRB	„Retinoblastoma protein“; E2F vazebný pocket protein; tumorsupresor
PRC	„Polycomb repressive complex“; podílí se na deaktivaci genů
PRE	„Polycomb repressive element“, regulační sekvence v oblasti promotoru genu
ORF	„Open reading frame“, otevřený čtecí rámec
ORI	„Origin of replication“; počátek replikace
RASSF1A	„Ras associated domain-containing protein 1“, tumorsupresor, účastní se oprav DNA
RAR	„Retinoic acid receptor“; jaderný receptor kyseliny retinoové; regulátor transkripce
RbAp46	„Retinoblastoma-associated protein 46“; transkripční represor
RbAp48	„Retinoblastoma-associated protein 48“; transkripční represor
RING1	E3 ubiquitin ligasa; podjednotka komplexu PRC1
SAM	S-adenosyl methyonin; koenzym metyltransferas
SCC	„Squamous cell carcinoma“; EC: 3.
SFRP1	„Secreted frizzled-related protein 1“; tumorsupresor, negativní regulátor Wnt signální dráhy
SFRP4	„Secreted frizzled-related protein 5“; tumorsupresor, negativní regulátor Wnt signální dráhy
SNAIL1	„Snail 1 zinc finger protein“; onkogení transkripční faktor
SPI	transkripční aktivátor, váže se do LCR HPV genomu
SUV	„Suppressor of variegation“, tumorsupresor, negativní regulátor Wnt signální dráhy
SUZ12	„Suppressor of zeste 12“; CpG protein
TAP1	„Antigen peptide transporter 1“; ABC transportér degradovaných cytosolových peptidů do ER
TBE	Tris/Borate/EDTA pufr
TBST	Tris-Buffered Saline/Tween 20 pufr
TEA	Tris/Acetate/EDTA pufr
TF	transkripční faktor
TLR	„Toll-like receptor“; receptor stromální dendritické buňky

	rozpoznávající HPV
TMC6	„Transmembrane channel-like 6“; integrální membránový protein endoplasmatického retikula; jeho gen bývá mutovaný u onemocnění epidermodysplasia verruciformis
TMC8	„Transmembrane channel-like 6“; integrální membránový protein endoplasmatického retikula; jeho gen bývá mutovaný u onemocnění epidermodysplasia verruciformis
TNF- α	„Tumor necrosis factor-alfa“; cytokin
UHRF1	„Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1“; E3 ubiquitin ligasa a DNA vazebnou doménou
UTR	„Untranslated region“, mRNA sekvence za nebo před kódující sekvencí genu
UTX	„Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome“; histon demetylasa
v-ATPasa	protonové vakuolární pumpa; zajišťuje acidifikaci endosomu
VLP	„Virus-like particles“; virální kapsid tvořený L1, vyvolává imunitní odpověď
WHSC1	také NSD2; histon N-lysin metyl transferasa; EC: 3.3.3.
<i>XIST</i>	„X-inactive specific transcript“; RNA transkript inaktivující X chromosom

IX. PŘÍLOHY

Příloha 1: tabulka výsledků imunohistochemie u některých vzorků obsahujících CIN3 a/nádor

	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	WHSC1	EZH2	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	WHSC1	EZH2
1						249		80	54	
2		60	20			282		20		
3						206	5	15		
4						300	95	110		
5	273	112	163		190	273	112	0		187
6						233	180	1		
7						240	0	60		
8						188	270	60	189	
9	290		0			109		0		
10				250					50	
11	245	0		85	105	300	120	100	160	270
12	290	15	70			180	50	5	90	
13										
14	250	210				280	200	130		
15		160	140		290		45	105		300
16						300	172	180		
17						119		5		
18	110					148				
19	60	45	45			196	0	215		
20						165	0	180		
21										
22						255	0	300		
23										
24						267	255	150		230

Příloha 2: Tabulka výsledků HPV typizace a určení formy HPV podle fragmentace genu pro E2, E-episomální, I- integrovaný, 1- pozitivní, 0- negativní

	HPV16	E2 fr.1	E2 fr.2	E2 fr.3	E2 fr.4	E2 fr.5	HPV18	E2 fr.1	E2 fr.2	E2 fr.3	E2 fr.4
1	I	0	0	0	0	0	0				
2	0						0				
3	0						I	1	1	0	1
4	I	0	0	0	0	0	0				
5	0						0				
6	E	1	1	1	1	1	0				
7	E	1	1	1	1	1	I	0	0	0	0
8	E	1	1	1	1	1	0				
9	E	1	1	1	1	1	0				
10	I	0	0	1	0	0	I	0	1	0	1
11	E	1	1	1	1	1	0				
12	E	1	1	1	1	1	0				
13	I	0	0	0	0	1	0				
14	I	0	0	0	1	1	0				
15	0						0				
16	I	0	0	0	0	0	0				
17	E	1	1	1	1	1	0				
18	E	1	1	1	1	1	0				
19	I	0	0	1	0	1	I	1	1	0	1
20	E	1	1	1	1	1	0				
21	0						0				
22	0						0				
23	I	0	0	0	0	0	0				
24	I	0	0	1	0	1	0				