UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE

miRNA jako triážový test u HPV-pozitivních pacientů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	**Bc. Ondřej Bouška**
Studijní program:	**Chemie**
Studijní obor:	**Bioorganická chemie a chemická biologie**
Typ studia:	**Prezenční**
Vedoucí práce:	**Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.**

Olomouc 2020

Já, Ondřej Bouška, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem Mgr. Vladimíry Koudelákové, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedl na konci práce.

Souhlasím s tím, aby tato diplomová práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

Poděkování

Chtěl bych poděkovat mé školitelce, Mgr. Vladimíře Koudelákové, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, její rady a poznatky, které mi při práci předala. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Hanuši Slavíkovi za pomoc a rady při práci v Laboratoři experimentální medicíny UMTM, Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. děkuji za statistickou analýzu dat pro tuto diplomovou práci, Tomáši Pospíšilovi a Lucii Továrkové za provedení testů QIAscreen a QIAsure. Týmu RNDr. Magdaleny Uvírové, Ph,D. z CGB laboratoře děkuji za provedení cytologického hodnocení. Děkuji i panu docentu MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za poskytnutí laboratorního zázemí.

I. BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení:	Ondřej Bouška
Název práce:	miRNA jako triážový test u HPV-pozitivních pacientů
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny – LEM
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	Infekce lidským papilomavirem (HPV) je hlavní příčinou rozvoje invazivního cervikálního karcinomu (ICC). Primární HPV testování je stále více zaváděno do cervikálních screeningových programů. Pro primární HPV screening je nutné vyvinout vhodnou triážovou metodu, jejímž cílem je rozlišení HPV pozitivních pacientek s vyšším rizikem a HPV pozitivních pacientek s nižším rizikem následného rozvoje ICC. Detekce různých molekulárních markerů, jako je míra exprese microRNA (miRNA), je slibnou metodou pro triážové testování HPV pozitivních pacientů. Ve screeningové populaci českých žen (n=1044) byla hrHPV pozitivita detekována u 160 žen (15,3 %). U těchto žen byla sledována konkordance detekce HPV u cervikálních a cervikovaginálních stěrů. Výsledek hrHPV detekce se shodoval u 92,9 % párových vzorků. Analýza změny exprese miRNA nepotvrdila možnost použití vybraných miRNA pro triážové testování v primárním HPV screeningu.
Klíčová slova:	lidský papilomavirus, triážový test, microRNA, cervikální screening
Počet stran:	87
Jazyk:	čeština

II. BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

First name and surname:	Ondřej Bouška
Title:	miRNA as a triage test in HPV-positive patients
Type of thesis:	Master's thesis
Department:	Institute of Molecular and Translational Medicine - LEM
Supervisor:	Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.
The year of presentation:	2020
Abstract:	Infection by human papillomavirus (HPV) is the main cause of the developing of invasive cervical cancer (ICC). Primary HPV testing is increasingly implemented in cervical cancer screening programs. It is a necessary to develop new appropriate triage method, that can stratify HPV-positive patients at increased risk of developing ICC and HPV-positive patients at low risk of ICC. Detection of various molecular markers, such as levels of microRNA (miRNA) expression, is promising method for triage testing of HPV-positive patients. In screening population of Czech women (n=1044), 160 women (15,3 %) were tested hrHPV-positive. Concordance of hrHPV detection was tested in cervical and cervicovaginal smears. Concordance of hrHPV testing in paired samples was 92.9%. Analysis of miRNA expression changes did not confirm the usability of selected miRNA for triage testing in primary HPV screening.
Keywords:	human papillomavirus, triage test, microRNA, cervical screening
Number of pages:	87
Language:	Czech

III. OBSAH

I. BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE: 4

II. BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION: 5

III. OBSAH 6

IV. TEORETICKÁ ČÁST 8

1. Úvod 8

2. Lidský papillomavirus 10

2.1. HPV genom 11

2.2. Životní cyklus HPV 17

2.3. Integrace hrHPV DNA do genomu hostitelské buňky 19

3. Cervikální karcinom 22

4. Cervikální screening 24

4.1. Cytologický screening 24

4.2. HPV screening 26

5. Triážové testy 28

5.1. Cytologie v případě primárního HPV screeningového programu 28

5.2. HPV genotypizace 30

5.3. p16/Ki-67 30

5.4. Metylační testy 31

5.5. Viral load 33

6. miRNA jako triážové biomarkery 34

6.1. Deregulace miRNA a jejich biologický cíl 36

6.2. miRNA analýza vs. konvenční triážové metody 38

V. CÍL PRÁCE 39

VI. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 40

1. HPV screening 40

1.1. Materiál a přístrojové vybavení 40

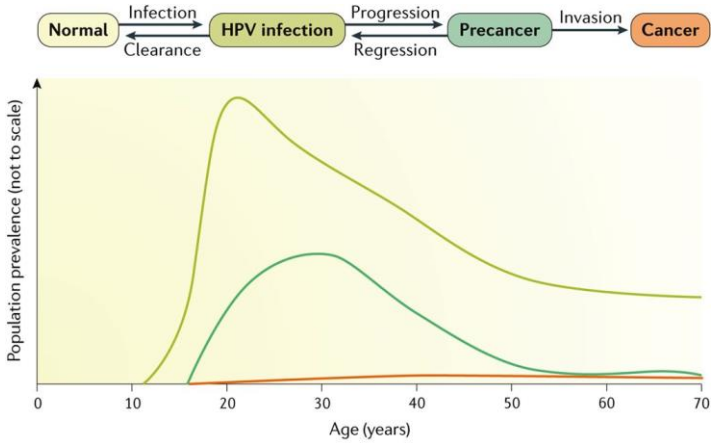
1.2. Pacientské stěry 40
1.3. Hybrid Capture® 2 41
1.4. QIAscreen HPV PCR Test 43
2. Určení miRNA profilu 44
2.1. Materiál a přístrojové vybavení 45
2.2. Izolace RNA 46
2.3. Příprava cDNA templátu 47
2.4. TaqMan Advanced miRNA Assay 49
3. QIAsure Methylation Test 51
4. Statistická analýza 52
VII. Výsledky 53
1. HPV screening 53
2. QIAsure metylační test vs. cytologické vyšetření 57
3. MiRNA analýza 60
VIII. DISKUZE 63
IX. ZÁVĚR 68
X. ABECEDNÍ SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 69
XI. REFERENCE 72

IV. TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

Infekce lidským papilomavirem (HPV) je pravděpodobně nejčastější sexuálně přenosnou virovou infekcí na světě. Pravděpodobnost nákazy lidským papilomavirem, alespoň jeden krát za život, je odhadována na 80 %.[1,2] V naprosté většině případů je virová infekce eliminována v období následujících 2 let.[3] V případě perzistence vysoce rizikových HPV, jako je například HPV 16 a HPV 18, však může dojít k rozvoji prekancerózních lézí nebo v krajním případě i rozvoji cervikálního karcinomu.[4]

Prevence rozvoje cervikálního karcinomu je rozdělena na dvě úrovně. Primární prevencí je vakcinace proti HPV a sekundární prevencí je cervikální screening.[5] Zavedení cervikálního screeningu do národních screeningových programů je v posledních dvou desetiletích celosvětově důležitým milníkem v prevenci a léčbě cervikálního karcinomu. Díky přibližně 20 let dlouhému intervalu transformace (obrázek 1), během něhož dochází k perzistenci HPV infekce a přechodu cervikálních intraepiteliálních lézí v cervikální karcinom, je cervikální screening vysoce efektivním nástrojem v prevenci a včasné detekci cervikálního karcinomu ve screeningové populaci žen.[6] Důsledkem pomalého rozvoje cervikálního karcinomu, zavedením vakcinačních programů a pravidelného cervikálního screeningu se z cervikálního karcinomu stává onemocnění, kterému lze ve většině případů úspěšně předcházet. Podle modelové studie by tak mohlo být v následujících 50 letech celosvětově zabráněno rozvoji 12,5-13,4 milionům nových případů cervikálního karcinomu.[7]



Obrázek 1: Průběh rozvoje cervikálního karcinomu ve vztahu k věku screeningové populace žen má 3 základní stádia, pro která jsou charakteristická různá období života – infekce, perzistence a rozvoj prekanceróz, karcinom. [8]

S rozšiřujícím se testováním jsou kladeny vysoké nároky na efektivitu, sensitivitu i specifitu jednotlivých metodik, které jsou využívány v rámci cervikálního screeningu. Z toho důvodu jsou vyvíjeny efektivnější testovací strategie, které jsou následně implementovány do screeningových algoritmů a hodnoceny pro plošné využití v praxi. Takovým příkladem je i implementace primárního HPV screeningu, který v posledních letech nahrazuje dosavadní cervikální screening založený na cytologickém vyšetření. Se zavedením primárního HPV screeningu vznikla i potřeba vhodného účinného triážového testu pro pacientky s pozitivním screeningovým HPV testem.[9] Právě tomuto tématu se věnuje i předkládaná diplomová práce.

2. Lidský papilomavirus

Lidské papilomaviry, které byly v dřívější době mylně řazeny společně s polyomaviry do čeledi *Papovaviridae*, nyní náleží do samostatné čeledi *Papillomaviridae,* uznané Mezinárodním výborem pro klasifikaci virů (ICTV).[10] Jde o malé, neobalené viry s cirkulární dsDNA o přibližné délce 6900-8400 pb, způsobující některá lidská i zvířecí onemocnění.[11] Do současné chvíle bylo objeveno přes 280 savčích a ptačích typů PV[12], z nichž více než 225 typů je schopno infikovat lidský organismus.[13] *Papillomaviridae* je čeleď, která je členěna do dvou podčeledí – *firstpapillomavirinae* a *secondpapillomavirinae*. *Firstpapillomavirinae* je dále rozdělena na více než 50 různých rodů, do kterých jsou na základě pravidel, přijatých v roce 1995 v Quebecu, přiřazovány konkrétní izolované a plně sekvenované typy papilomavirů.[14,10] Pro uznání nového typu PV musí být rozdíl mezi DNA sekvencí L1 ORF nového izolátu a DNA sekvencí L1 ORF nejpodobnějšího známého PV minimálně 10%. V případě 2-10% rozdílu v sekvenci hovoříme o podtypech už známého PV, v případě rozdílu menšího než 2% se jedná o variantu.[10]

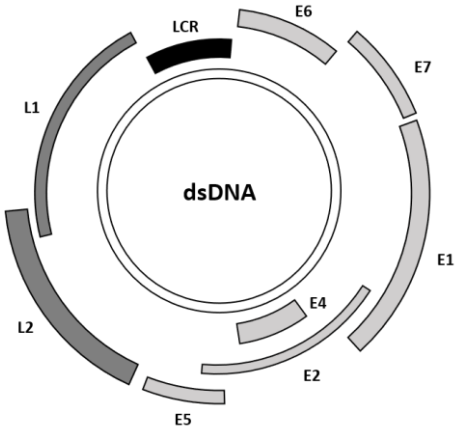
Z klinického hlediska jsou nejvýznamnější alfa-, beta-, gamma-, mu- a nu-papilomaviry, kam řadíme PV napadající lidský organismus.[15] Do rodu alfa-papilomaviry patří všechny typy HPV, které infikují lidský organismus skrze sliznici a kůži a mohou zapříčinit vznik karcinomu děložního čípku nebo benigní léze. Do rodu beta-papilomavirů řadíme velké množství HPV napadajících kůži, zapříčiňujících benigní i maligní kožní léze.[16,17] Gamma-, mu- a nu-papilomaviry jsou méně významné skupiny lidských papilomavirů, napadají kůži a způsobují benigní kožní léze bez zjevného vlivu na rozvoj maligních onemocnění.[18]

Právě na základě rizika vzniku karcinomu děložního čípku v případě perzistentní infekce jsou HPV děleny do dvou skupin – high-risk HPV (hrHPV) a low-risk HPV (lrHPV).[19] Mezi hrHPV do současné chvíle řadíme celkem patnáct typů HPV – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82. Kromě patnácti zmíněných hrHPV, jsou identifikovány další tři HPV typy – 26, 53 a 66, které jsou za určitých podmínek pokládané za karcinogenní.[17] Ze skupiny hrHPV jsou u cervikálních karcinomů nejčastěji identifikovány HPV 16, 18, 31, 33 a 45.[20] Do skupiny lrHPV se řadí HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 a CP6108[17], které způsobují bradavice a jiné benigní epiteliální léze[17], přičemž nejčastěji se vyskytující lrHPV jsou typy 6, 11, 53 a 66.[21,22] Jak v případě

hrHPV, tak i v případě lrHPV, je distribuce jednotlivých typů HPV v populaci odlišná v závislosti na geografické oblasti.[20]

2.1. HPV genom

Lidské papilomaviry obsahují cirkulární molekulu DNA o průměrné délce okolo 8000 pb. Společným znakem všech identifikovaných papilomavirů je jejich typická organizace genomu. DNA vlákno papilomavirů obsahuje celkem 8 nebo 9 otevřených čtecích rámců. HPV genom je rozdělen do tří funkčních oblastí (obrázek 2). První oblastí genomu je E region, obsahující tzv. časné geny E1, E2, E4, E5, E6 a E7, kódující stejnojmenné proteiny. Další oblastí je L region, v němž jsou lokalizovány tzv. pozdní geny L1 a L2 pro L1 majoritní kapsidový protein a L2 minoritní kapsidový protein. Poslední částí je nekódující region (NCR), taktéž nazývaný dlouhý kontrolní region (LCR), jenž je umístěn mezi genem pro majoritní kapsidový protein L1 a genem pro E6 protein.[18]

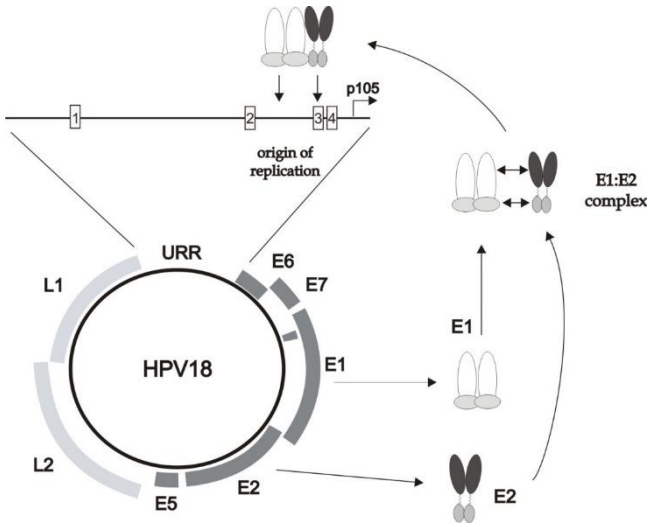


Obrázek 2: Genom lidského papilomaviru – dlouhý kontrolní region (černá), časné geny (světle šedá), pozdní geny (tmavě šedá) (upraveno podle[18])

2.1.1. E1, E2 a E4 proteiny

Exprese proteinů E1 a E2, které jsou produktem E1 a E2 genů, je klíčová pro iniciaci virové replikace v hostitelské buňce.[23] E1 protein (68 kDa) je pozitivní replikační regulátor s jednou z nejvíce zachovaných sekvencí ORF, mající ATPázovou a 3′→5′ DNA helikázovou aktivitu.[24,25,26] E2 protein (48 kDa) slouží jako transkripční aktivátor, mající N-terminální aktivační doménu a C-terminální specifickou DNA vazebnou doménu.[27]

Proteiny E1 a E2 tvoří E1-E2 komplex ve tvaru písmene C. Tento proteinový komplex je složený z E1-dimeru a E2-dimeru a díky jejich specifickým DNA vazebným doménám se váže do virového *Ori*. N-aktivační doména E2 blokuje C-terminální helikázovou doménu E1 a brání tak nežádoucí oligomerizaci E1 dimerů. Navázání E1-E2 komplexu na *ori* je prvním krokem v iniciaci replikace HPV genomu (obrázek 3), kterému následuje dimerizace E1-DNA vazebné domény, mající původně monomerní podobu. Následujícím krokem v procesu iniciace virové replikace je vazba dalšího E1 dimeru, čímž vzniká E1 tetramer. Vazba nového E1 dimeru je doprovázena současným odvázáním E2-dimeru a spotřebou molekuly ATP. V následující fázi dochází k navázání zbylých E1 dimerů, potřebných k dokončení formování E1 double hexameru. Na jednom virovém DNA vlákně jsou tedy v místě *ori* vytvořeny dvě hexamerní E1-helikázy, které rozvíjí dsDNA v opačném 3´→ 5´ směru. V průběhu rozvolňování virového dsDNA vlákna helikázou dochází k nespecifické interakci mezi pozitivně nabitým vnitřním prostorem helikázy a záporně nabitou fosfátovou kostrou nukleové kyseliny.[28,29]



Obrázek 3: Tvorba prereplikačního komplexu E1-E2, který se váže do virového počátku replikace a podílí se na iniciaci replikace.[30]

V okamžiku vytvoření dvou hexamerních E1 helikáz a iniciaci replikace rozvolněním dsDNA, jsou do procesu virové replikace rekrutovány ostatní enzymy, potřebné pro správnou virovou replikaci. DNA polymeráza α, topoizomeráza I a replikační protein A (RPA) jsou vázány E1 helikázou do replikačního počátku *ori*.[31,32,33]

Kromě účasti na iniciaci virové replikace, E2 slouží jako transkripční regulátor E6 a E7 otevřených čtecích rámců. E2 transkripční faktor je schopen, jak aktivovat

transkripci E6 a E7 genů, tak způsobit represi těchto virových genů, v závislosti na několika faktorech. V případě vysoké exprese E2, funguje E2 jako represor exprese E6 a E7 genů. V opačném případě, je-li hladina E2 nízká, dochází k aktivaci E6 a E7 genů. Výsledná aktivita E2 transkripčního regulátoru je závislá i na délce transkriptu. Je-li E2 v plné délce, funguje jako transkripční aktivátor. Kratší izoformy E2 způsobují represi transkripční aktivace.[34,35]

Nejvíce exprimovaným proteinem v rámci virového genomu je protein E4, kódovaný E4 otevřeným čtecím rámcem, jehož sekvence se překrývá se sekvencí většího E2 genu. Primárním produktem exprese E4 genu je fúzní E1^E4 protein, získaný sestřihem primárního E1^E4 transkriptu, který obsahuje několik aminokyselin, získaných z N-konce E1 proteinu.[36] Protein E4 je významně exprimován současně se začátkem vegetativní virové DNA replikace, vždy před expresí L1 majoritního a L2 minoritního kapsidového proteinu. Distribuce a skládání virového E4 proteinu je rozdílná u různých typů HPV. Příkladem může být E4 protein HPV1, který je výhradně cytoplazmatický a je skládán do inkluzí, které se zvětšují, jak buňka stoupá k svrchním vrstvám epitelu. E4 protein HPV16 je lokalizován na filamentech nebo v perinukleárním prostoru u buněk nižších epiteliálních buněk. Ke skládání dochází až u značně diferenciovaných buněčných vrstev.[37]

Protein E1^E4 je schopný interagovat s keratinovými intermediárními filamenty infikovaných buněk. E1^E4 protein je rozdělen na N-terminální vazebnou doménu s vysokým obsahem leucinu v aminokyselinové sekvenci, díky níž se váže na keratin. Druhou částí je C-terminální doména, zprostředkovávající multimerizaci E1^E4 proteinů. Všechny alfa-HPV vykazují schopnost vázat keratin, multimerizovat a následně reorganizovat síť intermediárních filament, čímž dochází k narušení celistvosti sítě. Interakcí keratinových intermediárních filament s E1^E4 proteinem dochází k aktivaci stresem aktivovaných proteinových kináz (SAPK), konkrétně p38 MAPK a JNK. p38MAPK a JNK hyperfosforylují keratinová vlákna, čímž dochází k jeho reorganizaci, ubiquitinylaci a degradaci v proteazomu.[38,39]

Kromě výše popsaných vlastností, je E4 protein také schopný iniciovat zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi. K zastavení buněčného cyklu dochází v případě nadměrné exprese E4 bez ohledu na to, zda dochází k narušení cytoskeletálních keratinových

struktur. Klíčovou roli v zastavení buněčného cyklu hraje vazebná doména nacházející se v úseku mezi aminokyselinami 21 a 59 E4 proteinu.[40]

2.1.2. E5, E6 a E7 onkoproteiny

Expresí E5, E6 a E7 otevřených čtecích rámců jsou produkovány E5, E6 a E7 onkogenní proteiny, které se různými procesy podílí na vzniku karcinomu děložního hrdla u perzistentních infekcí.

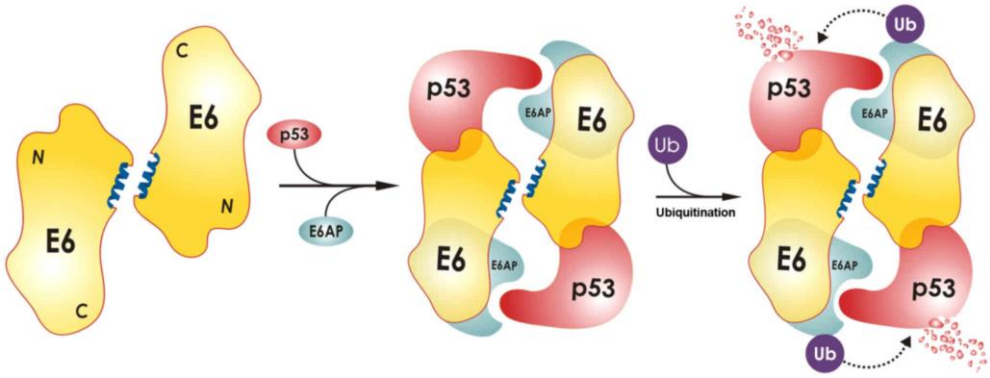
E5 onkoprotein je nejmenší ze tří zmíněných onkoproteinů, jehož řetězec se liší u různých typů PV – 44 aminokyselin u BPV-1, 83 aminokyselin hrHPV-16.[41,42] E5 je hydrofobní transmembránový protein, lokalizovaný v jaderné membráně, membráně Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula.[43] Transmembránové domény E5 onkoproteinu jsou tvořeny α-helixy, ty spolu vzájemně interagují díky hydrofobním interakcím a vytvářejí homodimery nebo celé komplexy.[44] Produkce E5 onkoproteinu není esenciální pro životní cyklus viru, což dokazuje i úplná represe jeho exprese u některých rodů PV. E5 onkoprotein je kódován a exprimován například u všech alfa-HPV, naproti tomu beta-HPV E5 onkoprotein neexprimují. Mezi HPV typy, schopné exprimovat E5 onkoprotein, patří všechny high-risk HPV a deset low-risk HPV, způsobující benigní léze. Ostatní HPV, které neexprimují E5 onkoprotein, postrádají E5 ORF nebo start kodon pro translaci.[45]

E5 protein je klasifikován jako onkogenní protein na základě jeho schopnosti amplifikovat mitogenní signalizaci přes EGFR signální dráhu.[46] Za předpokladu nadměrné exprese, je synergický účinek E5 proteinu s EGF zajištěn interakcí a vazbou na 16-kDa podjednotku vakuolární protonové ATPázy.[43] Vazbou 16-kDa podjednotky H^+-ATPázy dochází k narušení endozomální pH rovnováhy a degradaci EGFR. E5 onkoprotein inhibuje acidifikaci keratinocytových endozomů, čímž vzrůstá pH a dochází inhibici lysozomální degradace EGF receptorů. EGFR je následně recyklován zpět do plazmatické membrány.[47]

E6 otevřený čtecí rámec kóduje okolo 150 aminokyselin dlouhý E6 onkoprotein s molekulovou hmotností mezi 16-18 kDa. V aminokyselinové sekvenci E6 onkoproteinu jsou přítomné čtyři Cys-x-x-Cys motivy.[48] Charakteristickým znakem pro hrHPV, napadajících anogenitální sliznice, je přítomnost PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) vazebného motivu (PBM) na C-konci,[49] který umožňuje interakci se substráty, disponujícími PDZ doménou. Low-risk HPV PDZ vazebný motiv neobsahují.[50] Interakcí PBM E6

onkoproteinu s proteiny, které obsahují PDZ doménu, dochází k jejich ubiquitinylaci a následné degradaci. Mezi proteiny, které obsahují PDZ doménu a jsou tudíž degradovány v buňkách s exprimovaným E6 onkoproteinem, patří hDlg[51], hScrib[52], MUPP1[53], MAGI-1[54], MAGI-2 a MAGI-3[55]. Degradace takových proteinů má za následek narušení virového životního cyklu, ve smyslu redukované replikační kapacity a neschopnosti udržení virového genomu ve formě episomu.[56]

Bezesporu nejvíce studovanou vlastností hrHPV E6 onkoproteinu je jeho schopnost redukovat hladinu proteinu p53[57], tumor supresorového proteinu, který je kódovaný genem TP53. E6 onkoprotein vytváří terciární komplex s E6-AP ubiquitin ligázou a p53 (E6-E6AP-p53). E6 onkoprotein se váže na krátký centrální úsek E6-AP, čímž vzniká E6-E6AP heterodimer.[58] E6-E6AP heterodimer následně váže p53, který je následně ubiquitinylován pomocí E6AP podjednotky a nakonec degradován v proteazomu (obrázek 4).[59]

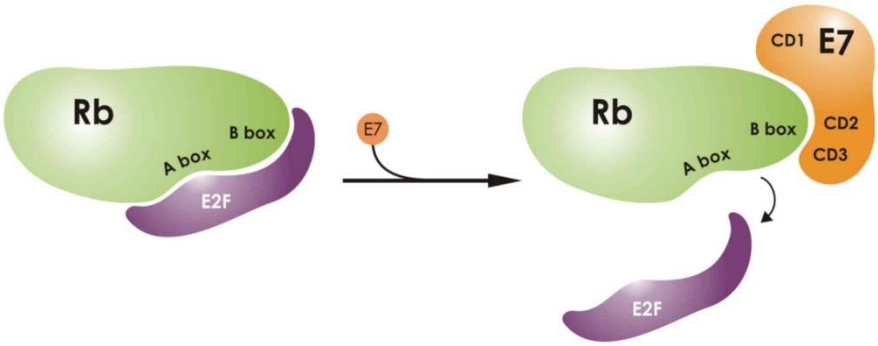


Obrázek 4: Degradace proteinu p53, zprostředkovaná E6-E6AP řízenou ubiquitinací.[60]

Proces karcinogeneze je, kromě degradace tumor supresorového proteinu p53, podpořen i aktivací telomerázy v keratinocytech.[61] Mechanismus aktivace lidské telomerázy spočívá v transkripční aktivaci promotoru genu pro hTERT (lidská telomerázová reverzní transkriptáza).[62]

E7 onkoprotein představuje společně s E6 onkoproteinem dva hlavní transformující proteiny exprimované hrHPV. Časný E7 ORF kóduje v průměru 100 aminokyselin dlouhý E7 onkoprotein. Jeho řetězec je rozdělen na 3 části – N-terminální část (CR1), středovou část (CR2) a C-terminální část (CR3).[63] N-terminální doména vykazuje podobnost s CR1 doménou a středová vazebná doména s CR2 doménou adenoviru E1A a polyomaviru SV40 T. CR1 a CR2 domény jsou důležité pro buněčnou transformaci a degradaci pRB (obrázek 5). CR2 doména obsahuje ve své sekvenci

fosforylační doménu kasein kinázy II a pRB vazebný motiv LXCXE, který je zodpovědný za vazbu „pocket“ proteinů – pRB, p107 a p130.[64] C-terminální CR3 doména, odpovídající za vazbu kovů[65] a dimerizaci E7 onkoproteinu,[66] obsahuje dvě CXXC domény, které jsou oddělené 29 aminokyselinovým můstkem.



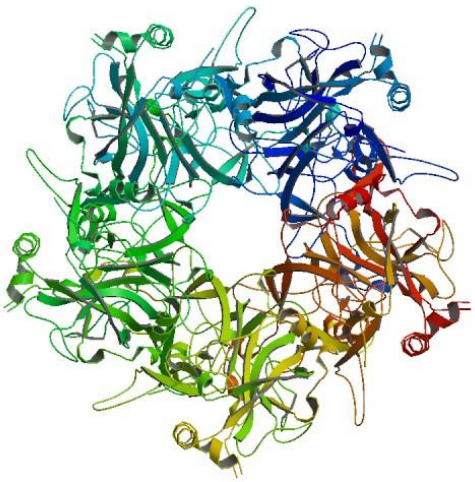
Obrázek 5: Interakce HPV E7 proteinu s pRB přes CD2 LXCXE a CD3 CXXC doménu (někdy nazývané CR2 a CR3).[60]

Rodina „pocket“ proteinů řídí přestup buňky z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu regulací aktivity E2F transkripčních faktorů.[67] V případě normálních buněk pRB zprostředkovává vazbu HDAC (histondeacetyláz) na promotery E2F-řízených genů[68] a přímo váže transaktivační doménu E2F transkripčních faktorů[69], čímž dochází k inhibici exprese E2F-řízených promoterů. Na konci G1 fáze je pRB fosforylován komplexem cyklin D-Cdk4/6 a E-Cdk2, čímž dochází k uvolnění vazby E2F a následné expresi časných S-fázových genů.[70] E7 onkoprotein je schopný se vázat na pRB a zprostředkovat jeho degradaci v proteazomech, čímž dochází k narušení kontroly buněčného cyklu.[64,71] V důsledku inhibice pRB E7 onkoproteinem nedochází ke vzniku komplexu pRB-E2F[72], což má za následek aktivaci E2F-řízených promoterů a následně kontinuální expresi S-fázových genů pro cyklin A a cyklin E.[73]

E7 onkoprotein je také schopen vázat a inhibovat aktivitu p21 a p27, dvou CDK inhibitorů. Vazbou C-terminální domény E7 onkoproteinu na p21 a p27, nedochází k poklesu aktivity Cdk2 a pozastavení buněčného cyklu.[74,75] Proteiny p21 a p27 u lidských keratinocytů inhibují regulační aktivitu komplexu A/E-Cdk2 při přestupu z G1 fáze do S-fáze.[76,77] Kromě toho je také E7 onkoprotein schopen zvyšovat aktivitu buněčné CDC25A fosfatázy, která je zodpovědná za aktivaci cyklin E-Cdk2 a cyklin A-Cdk2 komplexů defosforylací tyrosinů.[78,79]

2.1.3. Kapsidové proteiny L1 a L2

Virová cirkulární DNA je uložena v ikosahedrální kapsidě, která je tvořena L1 majoritními a L2 minoritními kapsidovými proteiny, kódované L1 a L2 ORF. Virová schránka je složena celkem z 72 pentavalentních L1 kapsomer (obrázek 6), ve kterých je vázáno 360 kopií L1 proteinu.[80] L1 proteiny se rychle skládají do kapsomer díky hydrofobním interakcím.[81] L2 protein interaguje s L1 kapsomerami hydrofobní interakcí aminokyselinové sekvence poblíž C-konce L2 proteinu[82] a je tak vložen do centrálního volného místa pentavalentní L1 kapsomery.[83] Poměr počtu molekul L1 proteinu a L2 proteinu (L1:L2) je v rámci jedné kapsidy asi 10:1, což v průměru odpovídá 36 molekulám L2 proteinu.[83] L2 minoritní kapsidový protein není nezbytný pro složení nové kapsidy, nicméně jeho exprese a účast na tvorbě virového kapsidu zvyšuje enkapsulaci DNA a infekčnost nového virionu.[84] Mezi jednotlivými pentavalentními kapsomerami jsou vytvářeny intermolekulární disulfidové vazby, tvořené u HPV 16 Cys175 první L1 kapsomery a Cys428 C-terminální domény druhé L1 kapsomery.[85]



Obrázek 6: Pentamerní struktura L1 majoritního kapsidového proteinu HPV11[86]

2.2. Životní cyklus HPV

První fází HPV infekce je napadení hostitelské buňky virovou částicí a její translokace do buňky. Lidský papilomavirus napadá bazální vrstvu epiteliálních buněk, které jsou infekci vystaveny v důsledku různých mikroporanění.[87] Pro úspěšné infikování hostitelské buňky papilomaviry musí dojít k interakci L1 proteinu s extracelulárními heparinsulfát proteoglykany.[88] Pro dosažení vazby s membránovými receptory PV přechodně interagují i s ECM (extracelulární matrix), konkrétně

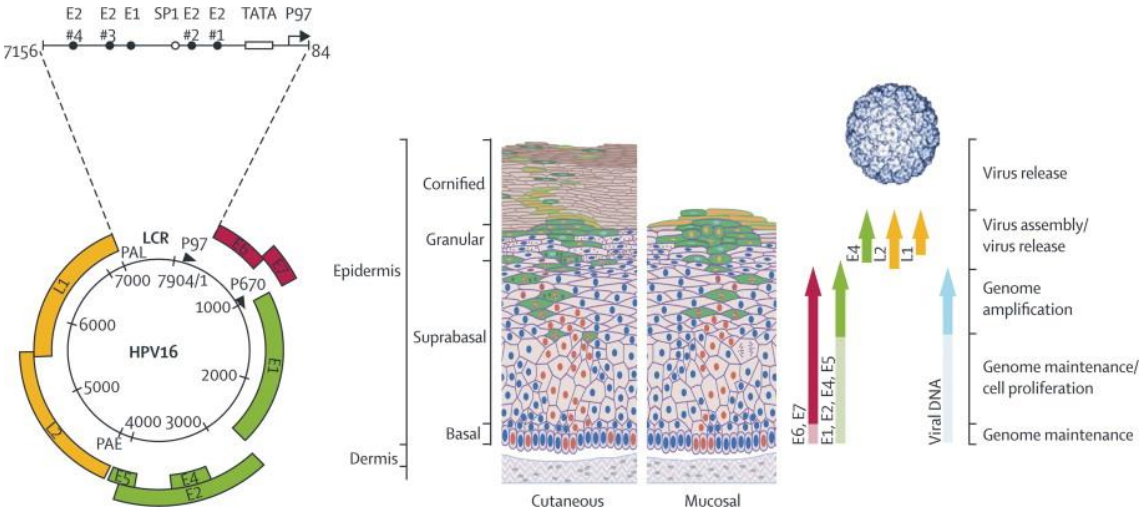
s lamininem 5, který je produkovaný migrujícími keratinocyty.[89] V důsledku vazby virové částice na povrch napadené buňky dochází k prvním strukturním změnám virové kapsidy a odkrytí L2 proteinu, který je pomocí pro-proteinové konvertázy furinu sestřižen v místě furinové specifické N-terminální aminokyselinové sekvence.[90] Tím dochází k sekundárním strukturním změnám virové kapsidy, navázání virové částice na sekundární receptory a transfer do buňky. Transfer je zprostředkován endocytózou, řízenou polymerizací a depolymerizací aktinu, nezávisle na klathrinu, kalveolinu, AP-2 ani dynaminu-2.[91]

Po přesunu do cytoplazmy je virová částice uzavřena nejprve v časném endozomu, který po fúzi s lysozomy maturuje v pozdní endozom, virová kapsida se v prostředí s nízkým pH rozpadá a L1 protein je degradován.[92,93] Po rozbalení virové kapsidy však malé množství L1 proteinu stále interaguje s L2 proteinem[94], který se váže na virovou DNA, tvoří tak L2/DNA komplex[95]. L2/DNA komplex je směrován a translokován do jádra hostitelské buňky. Po translokaci do jádra je L2/DNA komplex naveden na PML tělíska, místa časné virové transkripce a replikace.[95]

Druhou fází životního cyklu HPV je produkce a udržení stálého počtu kopií virového genomu v epizomální podobě, asi 50-100 kopií na jednu infikovanou buňku bazální vrstvy.[96] Virová replikace je závislá na hostitelském DNA replikačním komplexu a produkci E1 a E2 proteinů, které iniciují virovou replikaci.[23] Pro vytvoření perzistentní infekce jsou v malé míře v této fázi exprimovány i E6 a E7 onkoproteiny.[97] Indukují vstup napadené buňky do S-fáze buněčného cyklu a zajišťují tak podmínky pro udržení počtu virových epizomů v jádře nediferenciovaných bazálních keratinocytů.

Třetí fází životního cyklu HPV je produktivní replikace, jejímž cílem je amplifikace virového genomu.[98] V případě neinfikovaných buněk dochází k dokončení buněčného cyklu, opuštění bazální vrstvy a jejich plné diferenciaci. Lidské papillomaviry však mají díky E6 a E7 proteinům, které inaktivují tumor supresorové proteiny p53 a pRB[57,72], schopnost zamezit opuštění buněčného cyklu a nastartování apoptózy. Tím je již diferenciovaná buňka opět donucena vstoupit do nové S-fáze buněčného cyklu a je iniciována amplifikace genomu.[99] Pro zajištění vhodných podmínek pro produkci vysokého počtu virových DNA kopií je v této fázi infekce indukována exprese E1, E2, E4 a E5 proteinů, E6 a E7 proteiny jsou exprimovány v menší míře.[100,101,102]

Poslední fází virového životního cyklu je skládání a uvolnění nových virových částic z vrchních vrstev epitelu. Pro tuto fázi je typická produkce E4 proteinu, která předchází produkci L1 a L2 kapsidových proteinů.[37] Prvním exprimovaným kapsidovým proteinem je minoritní L2 protein, který se zdá být klíčový pro enkapsulaci virového genomu.[103] L2 protein se akumuluje v jádře buňky u PML tělísek[104] a rekrutuje na toto místo i L1 majoritní kapsidový protein, jenž je exprimován až po L2 proteinu.[105] L1 a L2 proteiny společně enkapsulují amplifikovaný HPV genom a nové virové kapsidy maturují a uvolňují se v průběhu deskvamace nejsvrchnějších vrstev epitelu (obrázek 7).[106]



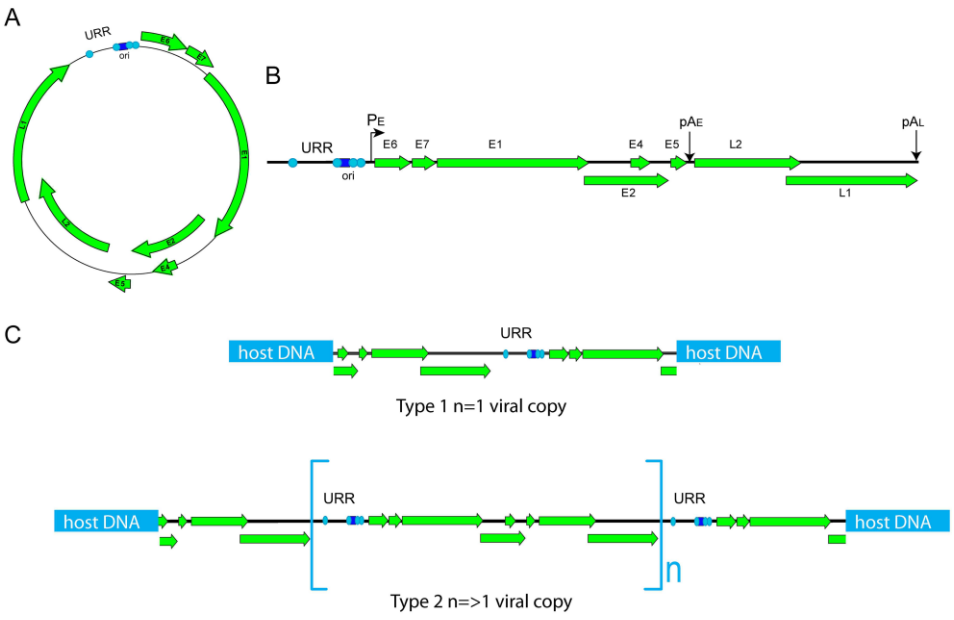
Obrázek 7: Životní cyklus HPV – komplexní proces napadení bazální epiteliální vrstvy sliznice nebo kůže, iniciace buněčné proliferace, amplifikace virového genomu, skládání nových virových částic a jejich uvolnění. Převzato z [107].

2.3. Integrace hrHPV DNA do genomu hostitelské buňky

Normální životní cyklus HPV zahrnuje rozpoznání hostitelské buňky, transport virové částice do buňky a dále epizomální virové DNA do jádra, virovou replikaci a expresi klíčových genů, sbalení nových virových částic a uvolnění ze svrchních vrstev epitelu. V některých situacích však může docházet k integraci virové DNA do genomu hostitelské buňky. Tento děj však není řazen jako další krok životního cyklu HPV, jelikož se integrací ztrácí schopnost tvořit cirkulární DNA a nové virové částice, které by mohly infikovat nové buňky.[108] Ve většině případů (až v 90 %) je infekce lidským papilomavirem eliminována buněčným imunitním systémem v rozmezí 8-14 měsíců bez zřetelných klinických projevů nebo symptomů. U perzistentní infekce však může dojít k integraci virové DNA a rozvoji karcinomu děložního hrdla.[109,110] Integrace virové DNA do buňky není společným znakem pro všechny nádorové buňky. Virová DNA se může

vyskytovat jen striktně v epizomální formě (dimery, multimery), integrované formě nebo jsou přítomny obě podoby virové DNA.[111] HPV-integrace je detekována ve více než 80% všech HPV-pozitivních cervikálních karcinomů. Při infekci HPV 16 byla identifikována integrovaná DNA u 76% vzorků, u HPV 18-pozitivních vzorků byla integrovaná virová DNA přítomna ve všech vzorcích.[112]

Virová DNA je do genomu hostitelské buňky integrována v podobě jednoho linearizovaného DNA řetězce nebo v podobě konkatemeru (obrázek 8).[113] Integrace probíhá nejčastěji v tzv. oblastech častých zlomů (common fragile sites, CFS), což dokazuje, že k integraci nedochází v náhodných místech.[114] CFS jsou specifické chromozomální sekvence, které mají tendenci k vytváření zlomů, do nichž se integruje virová DNA a dochází tak k významným modulacím hostitelského genomu.[115] Integrace virového genomu do intronů genů pro FHIT (fragile histidine triade protein) a LRP1B (low-density lipoprotein receptor-related protein 1B), významně snižuje expresi těchto proteinů. Integrací virové DNA do hostitelského genomu nedochází pouze k poklesu exprese příslušných genů. Příkladem jsou proteiny MYC a HMGA2 (high-mobility group AT-hook 2), jejichž exprese je v neoplastických tkáních zvýšena integrací HPV DNA do genomu.[116]



Obrázek 8: Integrace virového genomu do genomu hostitelské buňky - A. virový genom v kruhové podobě, B. virový genom v linearizované podobě, C. jednoduchá a násobná integrace virového genomu (převzato z [108])

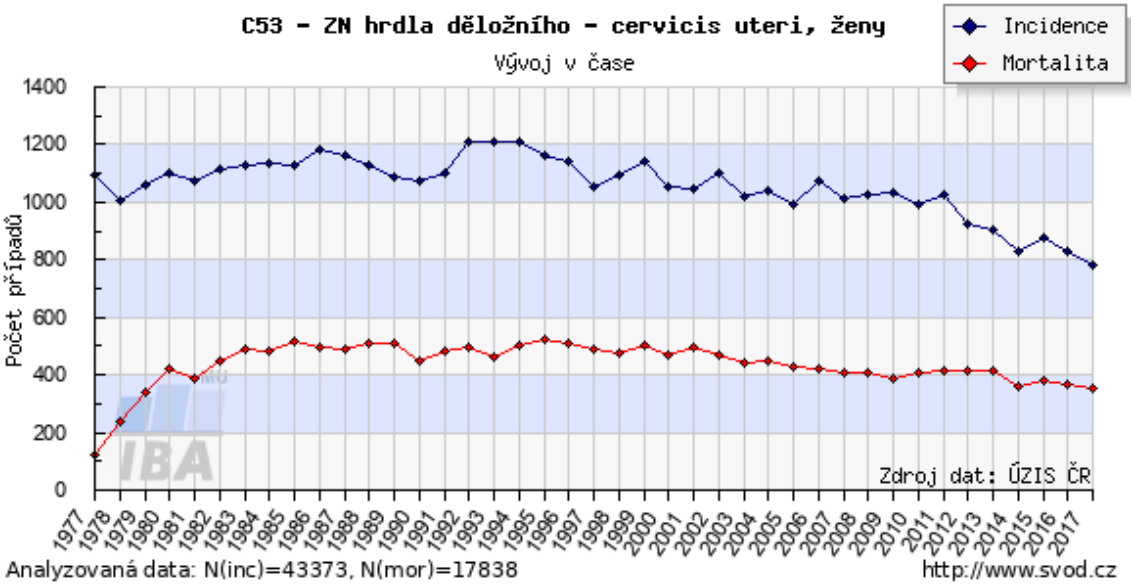
Do současné doby byly navrženy tři mechanismy, kterými se virová DNA integruje do hostitelského genomu. Prvním z nich je rolující model, při kterém jsou

několikanásobně vytvářeny smyčky v průběhu kruhové replikace. Výsledkem takové integrace je vícenásobné vložení lineární sekvence virové DNA v sérii za sebou, konkatemer.[117,118] Další model integrace virové DNA je založen na existenci mikrohomologních (MH) sekvencích virové DNA a hostitelského genomu v blízkosti CFS. FoSTeS (fork stalling and template switching) a MMBIR (microhomology-mediated break-induced replication), dva mechanismy MH-zprostředkované DNA opravy, se podle studie z roku 2015 mohou podílet na integraci virové DNA.[116]

Linearizací virové DNA a její integrací do hostitelského genomu preferenčně dochází k disrupci E2 ORF, zatímco E6 a E7 ORF jsou společně s LCR integrovány neporušené.[119] Rozštěpením E2 ORF, negativního transkripčního regulátoru E6 a E7 ORF, je indukována zvýšená exprese E6 a E7 onkoproteinů.[120] Integrace je důležitým mezikrokem v transformaci cervikální epiteliálních buněk, nicméně jako taková není dostatečná pro maligní transformaci.[113]

3. Cervikální karcinom

Cervikální karcinom je v celosvětovém měřítku s počtem 570 000 nových případů a 311 000 úmrtí čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí žen následkem maligního nádorového onemocnění.[121] V České republice bylo v roce 2017 diagnostikováno celkem 779 nových případů karcinomu děložního hrdla a zaznamenáno 354 úmrtí následkem tohoto nádorového onemocnění (obrázek 9). [122]



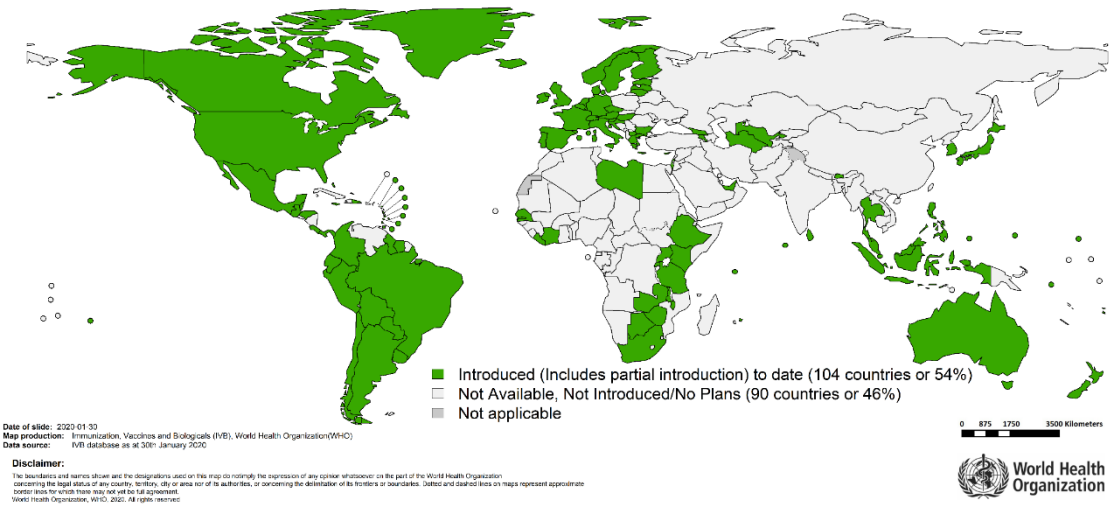
Obrázek 9: Incidence (modrá) a mortalita (červená) cervikálního karcinomu v České republice v období let 1977 až 2017.[122]

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou karcinomy děložního hrdla z morfologického hlediska klasifikovány do několika základních skupin, mezi něž patří hlavně skvamocelulární karcinom (SCC), adenokarcinom (AC) a adenoskvamózní karcinom (ASC) děložního hrdla.[123] Celosvětově převládajícím typem cervikálního karcinomu je skvamocelulární karcinom, který představuje 75% všech diagnostikovaných cervikálních karcinomů.[124] Adenokarcinomy a adenoskvamózní karcinomy představují 10-15% cervikálních karcinomů a zbylých 10-15% zaujímají méně často se vyskytující typy cervikálních karcinomů.[125]

Mezi prognostické faktory u cervikálního karcinomu patří především typ karcinomu, velikost nádoru, metastazování do lymfatického systému, úroveň exprese COX-2, vaskularita nádoru. Míra přežití pacientek bez lymfatických metastáz po radioterapii se v minulosti pohybovala mezi 85-95%, ale u pacientů s metastázami jen

mezi 45-55%. V porovnání se skvamocelulárním karcinomem vykazuje adenokarcinom horší prognózu dlouhodobého přežití.[126]

Prevence proti rozvoji cervikálního karcinomu spočívá ve dvou hlavních bodech. Prvním z nich je očkování proti HPV infekci a druhým je cervikální screening. V současné chvíli jsou v mnoha zemí světa dostupné tři různé profylaktické vakcíny proti HPV. Všechny tři byly vyvinuty použitím rekombinantní DNA technologie a obsahují purifikovaný L1 kapsidový protein, autenticky složený do formy prázdné virové kapsidy VLP (virus-like particles). První vakcínou, zavedenou v roce 2006, byla bivalentní vakcína Cervarix, která funguje proti HPV 16 a 18. Jako druhý byl v roce 2007 zaveden kvadrivalentní Silgard/Gardasil, jenž poskytuje imunizaci proti HPV 6, 11, 16 a 18. Poslední vakcínou, zavedenou v roce 2014, byl nonavalentní Gardasil9. Ten obsahuje purifikované L1 proteiny HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58. Do současné chvíle byla HPV vakcinace na národní úrovni zavedena celkem ve 104 zemích světa, což odpovídá 54 % zemí (obrázek 10).[127]



Obrázek 10: Země se zavedeným očkováním proti HPV v národním imunizačním programu (zelené).[128]

Volba konkrétního léčebného postupu u cervikálního karcinomu odpovídá, stejně jako v případě jiných nádorových onemocnění, věku pacientky, konkrétnímu typu karcinomu, jeho rozsahu, stadiu a možným nežádoucím účinkům s ohledem na aktuální stav pacientky. V případě chirurgické léčby se rozsah zákroku mění se stádiem karcinomu – od konizace u časných fází, až po radikální hysterektomii v případě větší nádorů. Pro časná invazivní stadia se kromě chirurgické léčby využívá i radioterapie. Pokročilá stádia

invazivního karcinomu děložního čípku jsou léčena kombinací radioterapie a chemoterapie.[126] Standartním chemoterapeutikem pro léčbu cervikálního karcinomu je *cis*-platina (samotná nebo v kombinaci).[129] Kromě *cis*-platiny se využívá ještě 5-fluoruracil, topotecan, paclitaxel, gemcitabine, ifosfamid, karboplatina a irinotekan.[126] Pro léčbu rekurentního, perzistentního nebo metastazujícího cervikálního karcinomu je testována trojkombinace paclitaxelu, karboplatiny a bevacizumabu (II. fáze klinického testování) a dvojkombinace atezolizumabu a bevacizumabu (II. fáze klinického testování).[130,131]

4. Cervikální screening

Předpokladem úspěšné léčby nádorového onemocnění je včasná detekce a stanovení diagnózy. Z toho důvodu jsou celosvětově zaváděny plošné screeningové programy, jejichž cílem je snížení počtu nových případů invazivního cervikálního karcinomu díky včasné detekci a léčbě prekancerózních lézí, potažmo snížení počtu úmrtí následkem rakoviny děložního hrdla. Primární prevencí proti rozvoji cervikálního karcinomu je očkování dívek a chlapců proti několika typům hrHPV před započetím sexuální aktivity (ve věku 9-13 let), na kterou navazuje sekundární prevence v podobě cervikálního screeningu u žen starších 30 let. Až do nedávné doby bylo jediným využívaným screeningovým testem konvenční cytologické vyšetření (Pap smear test), které je však nově doplněno modernější luquid-based cytologií (LBC), HPV DNA testováním a VIA testem (visual inspection with acetic acid).[5]

Podle modelové studie z roku 2019 by mělo být díky očkování proti lidskému papilomaviru, doplněnému o cervikální screening, zamezeno vzniku 12,5 až 13,4 milionů nových případů cervikálního karcinomu v následujících 50 letech.[7] V České republice cervikální screening probíhá od roku 2008. Screeningový proces je v současné době stále založený na cytologickém vyšetření a je poskytován v rámci preventivní gynekologické prohlídky.[132]

4.1. Cytologický screening

Cervikální screening je stále ve většině zemí založený na cytologickém testování, ať už konvenčním cytologickém testu (Pap test) nebo novější liquid-based cytologii. Pap-test byl poprvé popsán dr. Papanicolaou a jeho principem je cytologické hodnocení exfoliovaných buněk cervixu.[133] V případě konvenční cytologie jsou odebrané buňky přímo naneseny na mikroskopické sklíčko, ale u LBC je štěteček s odebranými buňkami

přenesen do zkumavky s příslušným transportním konzervačním mediem, z něhož je následně odebrán vzorek.[134]

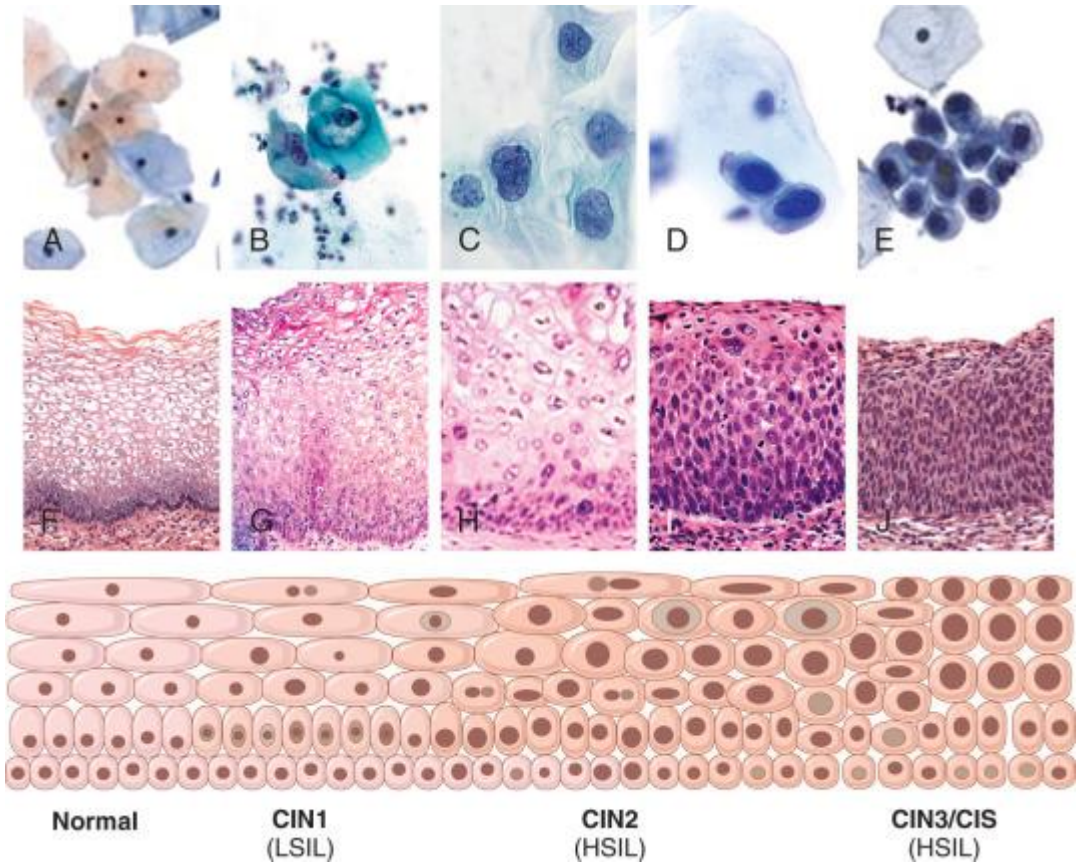
Od roku 1988 je pro hodnocení cytologických vyšetření využíván Bethesda systém, pomocí něhož jsou výsledky klasifikovány do osmi tříd.[135] Tento systém odpovídá staršímu třístupňovému systému interpretace histologických nálezů, který rozlišuje lehké cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN1), pro které je charakteristické poškození v rozsahu menším než jedna třetina epitelu. Dále středně těžké cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN2), u nichž jsou poškozeny dvě třetiny epitelu, a při těžké cervikální intraepiteliální neoplazii (CIN3) jsou léze patrny v celé tloušťce epitelu.[136]

Sjednocená Bethesda klasifikace cytologických nálezů je následující:

- **NILM (normální nález bez intraepiteliálních lézí a malignit)**
- **ASC-US (atypický skvamózní epitel nejasného původu)**
- **ASC-H (atypický skvamózní epitel high-grade lézi nelze vyloučit)**
- **LSIL (low-grade skvamózní intraepiteliální léze)** – zahrnuje buněčné změny, které byly asociovány s termíny koilocytóza, mírná dysplazie a CIN1; mezi kritéria, na jejichž základě jsou léze klasifikovány jako LSIL, patří například více než třikrát zvětšená buněčná jádra v porovnání s cytoplazmou, větší velikost buněk, binukleace a multinukleace, zvýšená buněčná keratinizace aj.
- **HSIL (high-grade skvamózní intraepiteliální léze)** – představuje klinicky významné buněčné změny, kam spadají středně těžké a těžké dysplazie (CIN2 a CIN3) a karcinom *in situ;* nejčastějšími znaky HSIL jsou malá buněčná velikost, vysoký poměr velikosti jádra a cytoplazmy, hyperchromazie, granulace chromatinu aj.
- **SCC (invazivní skvamocelulární karcinom)**
- **AGC (atypické žlázové buňky)**
- **AIS (adenokarcinom *in situ*)**
- **AC (adenokarcinom)**[136]

Model českého cervikálního screeningu je založen na primárním cytologickém vyšetření. V případě negativní cytologie je pacientkám doporučeno další cytologické testování v rámci příští preventivní prohlídku u ošetřujícího gynekologa (po 1 roce). Při jiném než negativním výsledku cytologického testu, je pacientka doporučena pro

opakovaný cervikální stěr v různých intervalech v závislosti na vážnosti cytologického nálezu, kolposkopii nebo expertní kolposkopii.[132,137]



Obrázek 11: Hodnocení cytologického vyšetření - Pap testu; část A-E cytopatologické přechody a část F-J histopatologické přechody z normální cervikální tkáně na LSIL a HSIL/karcinom in situ.[138]

4.2. HPV screening

Podle Evropské směrnice pro zajištění kvality screeningu karcinomu děložního hrdla (2015) v současné době v zemích Evropské unie probíhá zavádění primárního HPV screeningu, který by měl nahradit stávající cytologický screening. Mezi jediné dvě země evropského kontinentu, které již plně implementovaly primární HPV screening do programu cervikálního screeningu, patří Nizozemsko a Turecko. Ostatní státy, jako je například Španělsko, Finsko, Švédsko, Itálie, Belgie, Německo a Dánsko, jsou ve fázi zavádění, a nebo mají zavedení primárního HPV screeningu v plánu v následujícím blízkém období.[139]

Cervikální screening založený na primárním HPV screeningu vykazuje v porovnání s konvenčním cytologickým vyšetření mnohem lepší citlivost při záchytu

přednádorových změn děložního hrdla nebo samotného karcinomu.[140] Kromě vyšší sensitivity při detekci prekancerózních lézí děložního čípku se primární HPV screening vyznačuje také lepší reprodukovatelností, menšími finančními náklady na testování a možností zavedení samoodběrových sad pro HPV testování. Rutinní HPV testování by mělo být prováděno u žen od 30 let, přičemž v případě HPV negativity by mělo být opakováno v pětiletém intervalu až do 65 let. Implementací primárního HPV screeningu dochází díky nižší specifitě HPV testování k nárůstu pozitivních výsledků, potažmo doporučení k podstoupení kolposkopického vyšetření. Z toho důvodu je nutné zavedení sekundárního triážového testování, které by eliminovalo falešně pozitivní výsledky.[9]

Do roku 2015 bylo představeno celkem 193 komerčních HPV screeningových testů, z nichž minimálně 127 bylo na trhu volně dostupných, pouze velmi malá část však vyhovuje požadavkům pro HPV screeningové testy v rámci plošného cervikálního screeningu. Tyto molekulární screeningové testy jsou obecně založeny na detekci hrHPV DNA, detekci hrHPV DNA a současné částečné nebo plné genotypizaci hrHPV typů, detekci hrHPV E6/E7 mRNA, *in-situ* hybridizačních DNA nebo mRNA HPV testech.[141] Současným požadavkům na HPV screeningový test, které zahrnují především optimální balanci mezi co nejvyšší sensitivitou a specifitou pro záchyt CIN3+, plně vyhovuje pouze sedm komerčně dostupných testů. Mezi těchto sedm HPV testů, které prošly klinickou validací pro využití v rámci cervikálního screeningu, patří **HC2 HPV DNA Test** (Qiagen, USA), **GP5+/6+ PCR-EIA** (LaboBiomedical Products, The Netherlands), **Abbott RT hrHPVtest** (Abbott, Germany), **cobas 4800 HPV test** (RocheMolecular System, USA), **PapilloCheck HPV-Screening test** (Greiner Bio-One, Germany), **BD Onclarity HPVassay** (BD Diagnostics, USA) a **HPV-Risk assay** (Self-Screen, The Netherlands).[142] Nizozemí, první Evropský stát s implementovaným primárním HPV screeningem, využívá cobas 4800 HPV Test, který je založený na detekci hrHPV DNA a částečné genotypizaci HPV.[139,141,143]

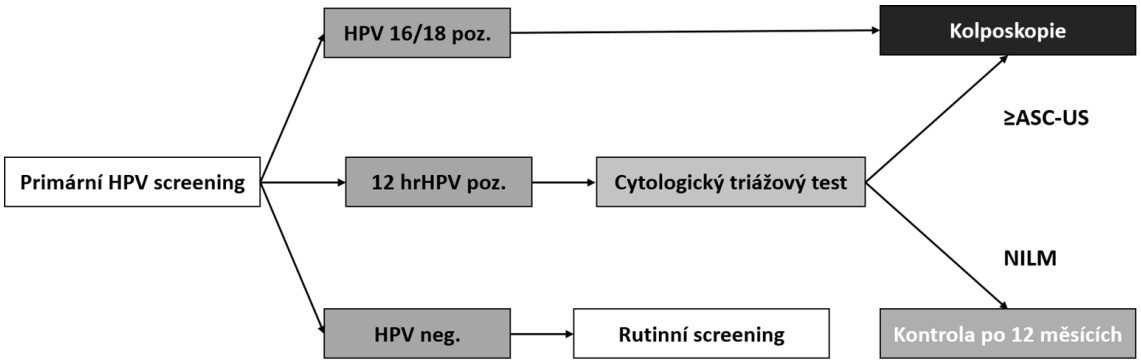
5. Triážové testy

Zavedení primárního HPV screeningu do programů cervikálního screeningu vyžaduje i evaluaci vhodné triážové metody, jak v případě samotného HPV screeningu, tak v případě kotestování HPV/cytologie. Při screeningu založeném na kotestování je triáž potřebná pro HPV pozitivní pacientky bez abnormálních cytologických nálezů. U samotného HPV screeningu je nutné provést triáž všech hrHPV pozitivních pacientek. Jako nejefektivnější jsou považovány triážové testy, pro něž je možné využít pacientského stěru, odebraného v rámci screeningového vyšetření.[144] Obecně používaným limitem pro nově zaváděný triážový test je minimální hodnota NPV (negativní prediktivní hodnota) pro CIN3+ 98 %. V případě 98% NPV je riziko rozvoje CIN3+ u pacientů s negativním výsledkem triážového testu 2 %.[145,146] Strategie triážového testování by měla poskytovat optimální bilanci mezi co nejvyšším počtem úspěšně detekovaných CIN3+ a zátěží, způsobenou vysokým počtem doporučení pro následnou kolposkopii.[143]

5.1. Cytologie v případě primárního HPV screeningového programu

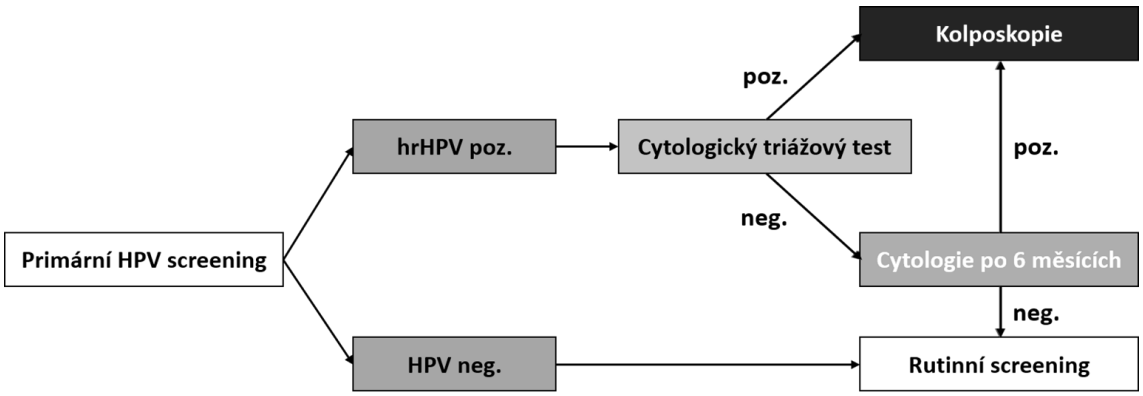
Cytologické triážové testování je v současnosti jediným triážovým testem, který je využíván při zavedení primárního HPV screeningu. Cílem cytologického triážového testování je odlišení skupiny pacientek s velmi nízkým rizikem vzniku karcinomu děložního čípku (HPV pozitivní ženy s normálním cytologickým nálezem) od pacientek s vyšším rizikem rozvoje (HPV pozitivní ženy s ASCUS+).[144] Nevýhodou cytologie je, že ji nelze použít u vzorků odebraných samoodběrem.

Přístup k zařazení cytologického triážového testování do cervikálního screeningu se liší u jednotlivých národních screeningových programů. Příkladem rozdílného přístupu k zařazení cytologického triážování po primárním HPV screeningu je algoritmus schválený v USA a Nizozemí. V obou případech je jako primární screening využíváno HPV testování. Ve screeningovém programu USA je však cytologické triážové testování zařazeno v případě negativní genotypizace HPV16/18, ale pozitivního testu na zbylých 12 hrHPV typů. Přímé doporučení pro kolposkopické vyšetření je podáváno na základě hrHPV16/18 pozitivity nebo ASCUS+ cytologickém nálezu. Při negativním cytologickém vyšetření (NILM) je doporučeno opakovat cytologii po dvanácti měsících (obrázek 12). Do screeningového procesu jsou řazeny ženy od 25 let a testování je doporučeno opakovat po uplynutí minimálně 3 let.[147]



Obrázek 12: Schématické znázornění screeningového algoritmu doporučeného v USA, zařazující cytologické triážové testování pro pacientky HPV16/18 negativní, ale pozitivní na přítomnost zbylých 12 hrHPV(vytvořeno podle[147]).

V Nizozemí je, na rozdíl od USA, cytologické triážové testování prováděno okamžitě u všech hrHPV pozitivních žen bez předešlé částečné genotypizace nejrizikovějších HPV virů. Na základě pozitivní reflexní cytologie jsou pacientky doporučeny pro následné kolposkopické vyšetření. V případě negativního výsledku je cytologie opakována po uplynutí šesti měsíců (obrázek 13). Do národního screeningového procesu Nizozemí jsou řazeny ženy ve věku 30-60 let (65, pokud byly při posledním testování hrHPV+). Pacientky jsou na screening zvány každých pět let do dovršení 40 let, poté je screening prováděn každých deset let. HPV screening žen ve věku 45 a 55 let je prováděn jen v případě vynechání testování ve věku 40 a 50 let nebo byl poslední screeningový test hrHPV+.[143]



Obrázek 13: Schématické znázornění screeningového algoritmu využívaného v Nizozemí, zařazující cytologické triážové testování pro všechny pacientky hrHPV pozitivní (vytvořeno podle[143]).

5.2. HPV genotypizace

Kromě cytologické triáže byl doposud v národním měřítku implementován ještě test, založený na genotypizaci nejrizikovějších typů HPV u pozitivních pacientek.[147,139] Nejvyšší riziko rozvoje CIN3+ bylo zaznamenáno u pacientek starších 30 let s pozitivním testem na přítomnost HPV 16.[148] Dalším nejrizikovějším onkogenním typem HPV je HPV 18, který vykazuje výrazně nižší rizikovost než HPV 16, ale je nejčastějším HPV typem u adenokarcinomů, a HPV 33.[149] Ačkoliv samotná HPV 16 a HPV 18 pozitivita nemůže vypovídat o perzistenci infekce v organismu nebo přítomnosti prekanceróz nebo karcinomu děložního hrdla, je vhodným ukazatelem rizika rozvoje ≥CIN3+.[150] Mezi země, které již využívají nebo zavádějí genotypizaci ve svém screeningovém algoritmu, patří například USA, Austrálie a Turecko.[147,151,152] Výhodným algoritmem primárního HPV screeningu je využití screeningové testu, jako je například cobas® 4800 HPV test, který současně s kvalitativní detekcí 12 hrHPV zahrnuje i částečnou genotypizaci HPV16/18.[153] Zavedení genotypizace HPV16/18 jako triážového testu záleží na momentálních možnostech daného státu, jeho kvalitě cytologického vyšetření a stanovené minimální hranice PPV (pozitivní prediktivní hodnoty) pro CIN3+.[154]

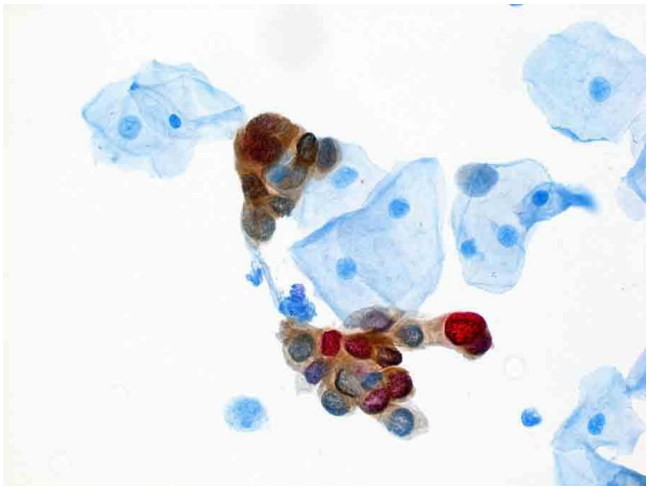
5.3. p16/Ki-67

Protein $p16^{ink4a}$ (p16), inhibitor cyklin-dependentních kináz, je jedním nejlépe evaluovaných molekulárních biomarkerů, jehož nadměrná buněčná exprese je spojována s rozvojem karcinomu a prekanceróz cervikální tkáně.[155] Původní triážový model u HPV pozitivních žen, zahrnující pouze detekci samotného p16, vykazoval vysokou sensitivitu v porovnání s cytologickým screeningem.[156] Avšak protein p16 může být exprimován také v některých netransformovaných buňkách, což vyžaduje další morfologické hodnocení.[157]

Tento problém se podařilo vyřešit zavedením imunodetekce dvou proteinů současně, $p16^{ink4a}$ a Ki-67, jejichž současná exprese se za fyziologických podmínek vylučuje, čímž bylo dosaženo vyšší specifity testu (obrázek 14).[158] Hladina proteinu Ki-67 je v G_0 fázi buněčného cyklu nulová, proto je jeho exprese striktně spjata pouze s proliferující buňkou.[159] p16/Ki-67 testování bylo hodnoceno jak pro triážové testování HPV-pozitivních pacientek[160,161], tak jako jedna ze screeningových metod.[162] Využití p16/Ki-67 cytologie jako triážového testu u HPV pozitivních pacientek vykazovalo vyšší sensitivitu a specifitu v porovnání s konvenčním cytologickým triážováním.[160] Pozitivní

p16/Ki-67 cytologické vyšetření u HPV-pozitivních pacientek vypovídá o vyšším riziku rozvoje prekancerózních lézí a cervikálního karcinomu, než je riziko u pacientek s negativním výsledkem.

P16/Ki67 cytologie tak představuje slibný přístup pro doporučení kolposkopie u HPV pozitivních pacientek při implementaci primárního HPV screeningu.[163] Příkladem testu, založeného na p16/Ki-67 imunodetekci, je CINtec Plus® cytologický test (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo), který má díky své vysoké sensitivitě a efektivitě vysoký potenciál pro triážové testování HPV-pozitivních pacientek.[164] Nevýhodou je, že test nelze použít u samoodběrových vzorků.



Obrázek 14: p16/Ki-67 duální test - červeně vizualizovaný jaderný Ki-67 (Fast Red) a hnědě vizualizovaný cytoplazmatický p16 (3,3´-diaminobenzidin)[165,166]

5.4. Metylační testy

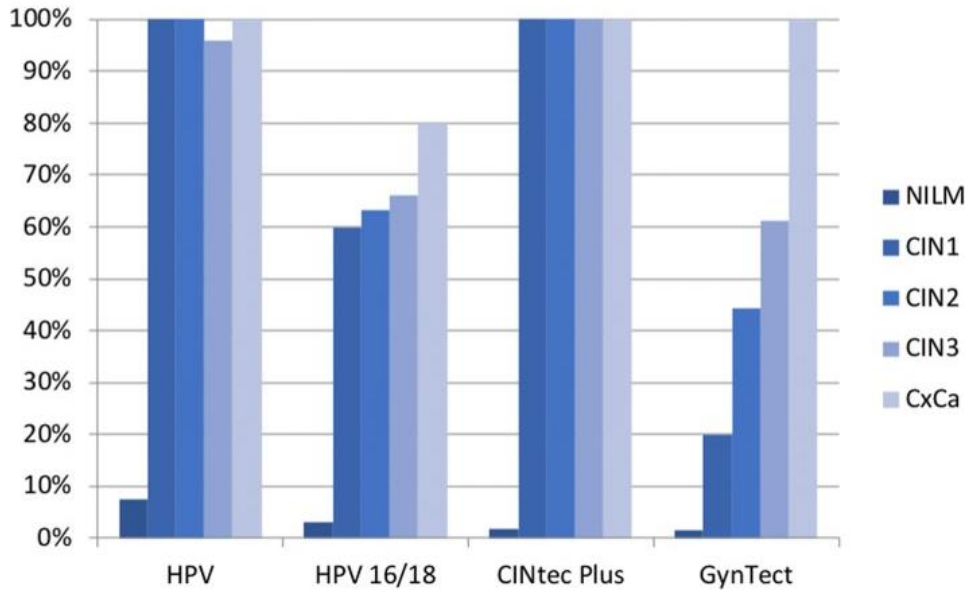
Epigenetické změny genomu jsou typické pro prekancerózní léze a karcinom děložního hrdla, přičemž nejčastěji studovaným epigenetickým markerem je metylace cytosinu v poloze 5-C hostitelského genomu i genomu HPV. Z hlediska rozvoje cervikálního karcinomu je významná zvýšená metylace cytosinu CpG sekvencí promoterů některých tumor supresorových genů, čímž je negativně ovlivněna transkripce těchto genů. Naproti tomu metylace virové DNA je spojena jak s negativním, tak s pozitivním ovlivněním virové transkripce.[167] Pro kvantifikaci hypermetylace tumor supresorových genů v buňkách děložního hrdla, získaných např. pomocí cervikálních stěrů, jsou využívány testy založené na QM-MSP (kvantitativní multiplexní metylačně-specifická real-time PCR).[168]

Metylační test QIAsure Methylation Test (Qiagen, Hilden, Německo), kvantifikující hypermetylaci genů *FAM19A4* a *mir124-2*, představuje díky své vysoké sensitivitě, specifitě a objektivnosti spolehlivý triážový test pro HPV pozitivní pacientky.[169] Z nedávné studie vyplývá, že metylační test FAM19A4/mir124-2 disponuje 77,8% sensitivitou a 69,3% specifitou pro detekci CIN3+ (NPV 98,3%, PPV 36,4%). Citlivějšího, ale zároveň výrazně méně specifického výsledku bylo dosaženo v případě triážového kotestování metylace FAM19A4/mir124-2 a genotypizace HPV16/18, při kterém bylo celkově dosaženo 93,1% sensitivity, ale pouze 49,4% specifity pro CIN3+ (NPV 97,9%, PPV 22,1%).[170] Pro HPV pozitivní pacientky (≥30 let) s negativním metylačním testem FAM19A4/mir124-2 bylo stanoveno 1,7% riziko rozvoje CIN3+ v následujících čtrnácti letech.[169] Velkou výhodou je, že je metylační analýza FAM19A4/mir124-2 také vhodná pro testování vzorků získaných pomocí samoodběrových sad. Její kombinace s genotypizací HPV16/18 poskytuje vyšší sensitivitu, ale nižší specifitu pro záchyt CIN3+.[171]

Společně s FAM19A4 byla pro panelové triážové testování analyzována i hypermetylace dalších dvou tumor supresorových genů, CADM1 a MAL. Výsledky ukázaly, že úroveň metylace FAM19A4, CADM1 a MAL se zvyšovala s vážností cytologického nálezu HPV pozitivních pacientek, zvláště u těch s HSIL+. Vysoká úroveň metylace genů FAM19A4 a MAL byla korelována s abnormálními cytologickými změnami, nezávislými na konkrétním typu hrHPV. Vysoká úroveň metylace genu CADM1 a pozitivní genotypizace HPV16/18/52/58 byly nezávisle korelovány s HSIL+. Sensitivita metylační analýzy CADM1, FAM19A4 a MAL v kombinaci s genotypizací HPV16/18 dosahovala 95,45% sensitivity pro HSIL+.[172] Na testování metylace genů CADM1 a MAL, společně s metylací genu miR-124-2, byl založen triážový test PreCursor M-kit (Self-Screen), pomocí něhož bylo z cervikálních stěrů detekováno 100% cervikálních karcinomů.[173] PreCursor M-kit v současné době není komerčně dostupný.

Další kvantitativním multiplexním metylačně-specifickým PCR pro triážové testování je GynTec® (oncgnostics GmbH, Jena, Německo), jehož panel obsahuje šest metylačních markerů – ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17 a ZNF671. Tato testovací metoda je využitelná pro cervikální stěry, využívající Specimen Transporting medium (STM, Digene HPV test, QIAGEN).[174,175] Sensitivita pro detekci cervikálního karcinomu byla 100%, pro CIN3 61,2%, pro CIN2 44,4% a pro CIN1 20,0%. GynTec metylační analýza byla porovnávána s CINtec Plus a cobas HPV, které vykazovaly 100%

sensitivitu pro všechny cervikální intraepiteliální neoplazie (viz. graf). Specifita detekce CIN3+ GynTec analýzou byla 94,6%, cobas HPV16/18 90,6%, cobas hrHPV 82,6% a CINtec Plus 69,9%. V porovnání s cobas HPV a CINtec Plus vykazoval GynTec výrazně vyšší specifitu, spolehlivě detekoval všechny případy ICC a detekoval dvě třetiny CIN (obrázek 15). GynTec-negativní CIN mohou představovat skupinu benigních lézí s postupnou regresí.[176]



Obrázek 15: Srovnání sensitivity různých čtyř možných triážových testů – HPV, HPV 16/18, CINtec Plus a GynTect.[176]

Dvě z posledních studií však popsaly i další slibné metylační panelové testy pro triáž HPV pozitivních pacientek. V prvním případě bylo využito vysoce efektivního triážového metylačního panelu (ASCL1, LHX8 a ST6GALNAC5) pro testování hrHPV pozitivních samoodběrových stěrů (sensitivita 88 %, specifita 81 %) i laváží (sensitivita 74 %, specifita 79 %).[177] Druhá studie testovala tři různé metylační panely, poskládané z výběru šesti genů – JAM3, EPB41L3, C13orf18, ANKRD18CP, ZSCAN1 a SOX1.[178]

5.5. Viral load

Spojitost mezi vážností cervikálních lézí HPV pozitivních pacientek a zvyšujícím se počtem kopií virové DNA (viral load) byla poprvé popsána v roce 1999.[179] Pro kvantifikaci virové zátěže byl využíván test Hybrid Capture 2, jehož prahová jednotka HPV pozitivity je ≥1 RLU/CO (relative light units/cut off). Pro doporučení kolposkopického vyšetření byla stanovena hodnota virové zátěže na ≥10 RLU/CO. Průměrná hodnota RLU/CO pro negativní/CIN1/CIN2/CIN3/CC nálezy byla

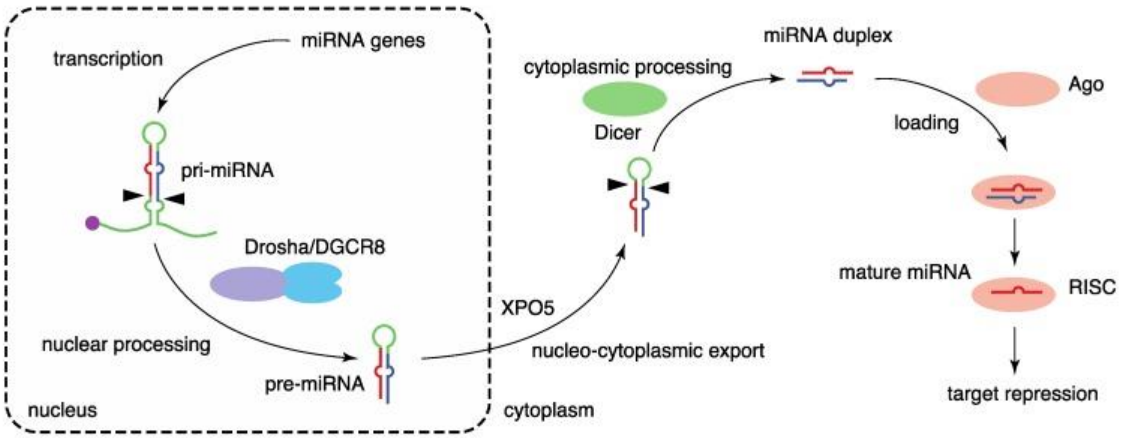
6,86/119,43/410,90/449,39/853,26. U pacientek s výsledkem ≥1<10 RLU/CO bylo doporučeno cytologické testování. Sensitivita/specifita triážového testování pomocí virové zátěže byla 93,13%/92,32% pro CIN2+ a 96,45%/91,44% pro CIN3+.[180]

Velmi dobrých výsledků dosahoval, v rámci primárního HPV screeningu, triážový test kombinující stanovení virové zátěže s částečnou HPV16/18 genotypizací. Použitím toho triážového testu bylo dosaženo optimálního poměru mezi sensitivitou, specifitou a mírou doporučení pacientek ke kolposkopickému vyšetření. Triážové testování HPV-pozitivních pacientek, pomocí virové zátěže v kombinaci s genotypizací HPV16/18, dosáhlo 95,04% sensitivity a 92,14% specifity při záchytu CIN3+. Stejných výsledků bylo dosaženo i kombinací virové zátěže s reflexní cytologií.[181]

6. miRNA jako triážové biomarkery

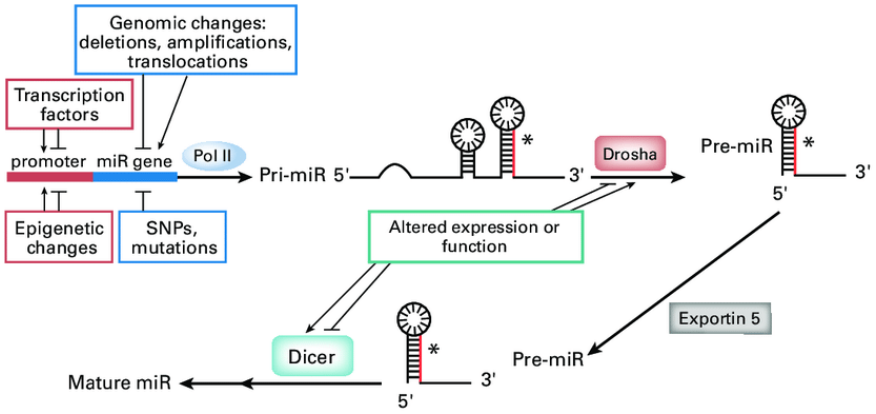
MicroRNA (miRNA) patří do velmi široké třídy regulačních nekódujících jednořetězových molekul RNA. Délka těchto malých nekódujících RNA je ~22 nukleotidů. Zásadní rolí, poměrně nedávno objevených regulačních biomolekul, je post-transkripční regulace exprese některých genů cílením komplementárních úseků mediátorové RNA (mRNA), čímž dochází k zablokování translace těchto mRNA nebo jejich degradace.[182]

Biogeneze miRNA probíhá v jaderném i cytoplazmatickém prostoru a je iniciována transkripcí genů pro miRNA pomocí RNA polymerázy II a III, čímž vzniká nukleární primární miRNA transkript (pri-miRNA).[183,184] Prvním krokem maturace miRNA je nukleární štěpení pomocí mikroprocesorového komplexu, který je složen z ribonukleázy III Drosha a RNA-vazebného proteinu DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8), čímž vzniká pre-miRNA.[185] Pro další štěpení je pre-miRNA sbalena do komplexu s exportinem-5 (nukleocytoplazmatický transportní faktor) a RanGTP, který umožňuje translokaci pre-miRNA do cytoplazmy.[186] V cytoplazmě je pomocí ribonukleázy III Dicer dokončena maturace miRNA, čímž vzniká ~22 nukleotidů dlouhý miRNA duplex (miRNA:miRNA*).[187] MiRNA:miRNA* duplex je následně rozvinut a dokončená jednořetězová miRNA je inkorporována do proteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), ve kterém slouží k cílení komplementárního úseku mRNA, určené k degradaci nebo umlčení (obrázek 16).[182]



Obrázek 16: Biogeneze miRNA - dvoufázový proces, který probíhá nejdříve v jaderném prostoru a následně v cytoplazmě, kde je dokončena maturace miRNA a váže se k RISC komplexu.[188]

Na základě dosavadních studií byla objevena spojitost mezi deregulací exprese některých miRNA (down- nebo up-regulace) a konkrétními lidskými onemocněními, mezi něž patří i nádorová onemocnění.[189] Různé vzorce exprese miRNA jsou specifické jak pro různé typy karcinomů,[190] tak tkáňově specifické.[191] Odlišná exprese miRNA může být obecně zapříčiněna změnami exprese syntetického aparátu miRNA, spřažením specifických transkripčních faktorů nebo genetickými (delece, amplifikace, translokace) a epigenetickými (DNA metylace a acetylace histonů) změnami (obrázek 17).[192] Podle studie z roku 2014, vykazuje analýza miRNA exprese vynikající výsledky při záchytu cervikálních intraepiteliálních lézí u HPV pozitivních cervikálních stěrů (v porovnání s konvenční cytologií), což indikuje její vysoký potenciál pro využití jako triážové metody HPV pozitivních pacientek.[193]



Obrázek 17: Hlavní příčiny deregulace exprese miRNA – změna exprese syntetického aparátu, spřežení specifických transkripčních faktorů, genetické a epigenetické změny. [194]

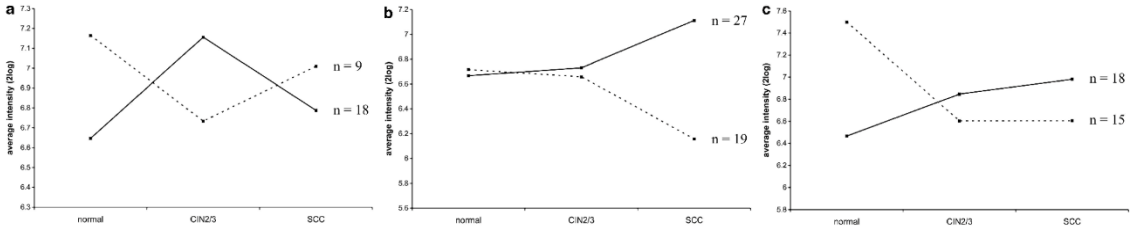
6.1. Deregulace miRNA a jejich biologický cíl

Z toho důvodu, že bylo mnoho genů pro lidské miRNA lokalizováno v oblastech častých zlomů a v takových chromozomálních sekvencích, které bývají ovlivněny v průběhu rozvoje karcinomů, jsou chromozomální alterace brány jako hlavní příčina změny exprese některých miRNA.[195] Deregulaci exprese miRNA v souvislosti s rozvojem cervikálního karcinomu se věnuje komplexní přehledový článek od Pardini et al., v němž je zahrnuto celkem 24 odborných studií, zaměřených na expresi miRNA ve vztahu k CC, a shrnuje tak současné možnosti využití deregulovaných miRNA jako triážového testu.[196] V jedné z posledních studií byl pro detekci CIN3+ a triáž HPV-pozitivních samoodběrových vzorků (laváže nebo stěry) identifikován panel devíti miRNA, jejichž exprese byla významně navýšena u CIN3+. Mezi tyto miRNA patří let-7b, miRNA-9, miRNA-15b, miRNA-20a, miRNA-31, miRNA-93, miRNA-183, miRNA-184, miRNA-222.[197] Up-regulace exprese miRNA-15b, miRNA-20a, miRNA-31, miRNA-93 a miRNA-222 v prekancerózních lézích byla zjištěna i v práci Li et al. (2011), v které je kromě pěti zmíněných miRNA popsána up-regulace i dalších dvanácti miRNA a celkem čtrnáct miRNA, které vykazovaly nižší hladinu exprese. Nejvýraznější down-regulace byla zaznamenávána v miRNA-218 expresi u CIN2-3 i SCC.[198]

V další studii byla srovnána změna regulace exprese miRNA u SCC, HSIL, LSIL a normální cervikální tkáně. Výsledky analýzy SCC prokázaly up-regulaci celkem 16 miRNA a down-regulaci 10 miRNA, přičemž nejvíce byly up-regulovány miRNA-21, miRNA-21*, miRNA-15b a miRNA-16 a down-regulovány miR-218 a miR-376. V porovnání s normální cervikální tkání byla u HSIL tkání zjištěna up-regulace celkem 13 miRNA a down-regulace 31 miRNA. Nejvýznamněji up-regulované byly miRNA-663, miRNA-188-5p, miRNA-765, miRNA-1300 a miRNA-483-5p a down-regulované miRNA-218, miRNA-376c, miRNA-374b, miRNA-149, miRNA-152 a miRNA-142-3. Mezi expresí miRNA u LSIL a NILM tkání nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl.[199]

Významné ovlivnění exprese celkem 106 miRNA bylo identifikováno v jednotlivých prekancerózních fázích (CIN2-3), invazivním skvamocelulárním karcinomu (SCC) a u cervikálního adenokarcinomu (AC). Ze 106 miRNA byla rozdílná exprese v CIN2-3 v porovnání s normální tkání a SCC detekována u 27 miRNA (18 up-regulovaných a 9 down-regulovaných miRNA). Dalších 46 miRNA vykazovalo změnu exprese pouze v SCC v porovnání s CIN2-3 a normální tkání (27 up-regulovaných a 19 down-regulovaných miRNA). Změna exprese u zbylých 33 miRNA (18 up regulovaných

a 15 down-regulovaných miRNA) byla detekována jak v případě CIN2-3, tak v případě SCC v porovnání s normální cervikální tkání (obrázek 18). Rozdílná exprese v SCC v porovnání s AC byla detekována u 18 miRNA.[200]



Obrázek 18: Deregulace exprese miRNA – a) 27 miRNA vykazovalo deregulaci ve fázi CIN2-3, b) 46 miRNA bylo deregulováno ve fázi CC, c) 33 miRNA vykazovalo deregulaci v CIN2-3 i CC. [200]

Vysoká variabilita exprese miRNA byla analyzována ve studii z roku 2010, v níž bylo identifikováno celkem 21 miRNA, jejichž exprese se v rámci progrese přes jednotlivá stádia různě měnila. Osm miRNA (miRNA-26a, miRNA-143, miRNA-145, miRNA-99a, miRNA-203, miRNA-513, miRNA-29a, miRNA-199a) vykazovalo sníženou expresi při přechodu z normální tkáně na CIN a cervikální karcinom. Snížená exprese při přechodu z normální tkáně na CIN a zvýšená exprese při přechodu z CIN na cervikální karcinom byla popsána u 6 miRNA (miRNA-106a, miRNA-205, miRNA-197, miRNA-16, miRNA-27a a miRNA-142-5p). Dvě miRNA (miRNA-522*, miRNA-512-3p) vykazovaly navýšenou expresi při přechodu z normální tkáně na CIN a sníženou expresi při přechodu z CIN na CC. Finálně 5 miRNA (miRNA-148a, miRNA-302b, miRNA-10a, miRNA-196a a miRNA-132) vykazovalo zvýšenou expresi jak při přechodu na CIN, tak na CC.[201]

MicroRNA, jejichž exprese je v případě maligních nádorových onemocnění vyšší než v normálních buňkách, jsou označovány jako onkogenní miRNA. Ty miRNA, jejichž hladina je v maligních nádorových onemocněních snížena, jsou považovány za tumor supresorové. Z hlediska rozvoje karcinomů hrají miRNA nezaměnitelnou regulační roli v dráhách, řídících například diferenciaci, apoptózu, proliferaci a udržování kmenových buněk pro relaps a metastazování.[202] Příkladem onkogenních miRNA je miRNA-9-5p, která negativně ovlivňuje expresi E-kadherinu, čímž je aktivována β-kateninová dráha indukující expresi genu VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), angiogenezi a metastazování.[203] Další onkogenní miRNA v rámci cervikálního karcinomu je i miRNA-10a, jejímž přímým molekulárním cílem je negativní regulace exprese CHL1

(close homolog of L1) na post-transkripční a post-translační úrovni, což podporuje buněčný růst, migraci a invazivitu cervikálního karcinomu.[204] MiRNA-21 post-transkripčně *in-vitro* negativně reguluje expresi PTEN, čímž je indukována buněčná proliferace a přežití buněk cervikálního karcinomu.[205] Příkladem down-regulovaných tumor supresorových miRNA, je miRNA-218-5p, která je schopná ovlivnit buněčný růst a metastazování cervikálního karcinomu skrze LYN/NF-κB signální dráhu.[206] Další down-regulovanou tumor supresorovou miRNA je miRNA-34a-5p, která je zahrnuta v p53 regulační buněčné kaskádě, řídící buněčný cyklus a apoptózu. Exprese miRNA-34a-5p je přímo regulována pomocí p53, který je ovšem v případě HPV infekce sám degradován HPV-E6 proteinem, tudíž není udržována dostatečná hladina p53 pro řízení exprese miRNA-34a-5p. Mezi biologické cíle miRNA-34a-5p, které ovlivňují proces apoptózy, zastavení buněčného cyklu, oprav DNA nebo senescenci, patří Bcl2, survivin, CDK4 a 6, WNT1, cyklin D a E.[207]

6.2. miRNA analýza vs. konvenční triážové metody

Studie porovnávající využití miRNA panelu se zavedeným DNA metylačním triážovým markerem, FAM19A4, využívala tři miRNA – miRNA-149, miRNA-20a a miRNA-93. Testovaný miRNA panel vykazoval vyšší prediktivní hodnotu pro CIN2+, zatímco sensitivita FAM19A4 metylačního markeru byla vyšší u CIN3+. Z výsledků této studie vyplývá, že miRNA analýza (samotná nebo v kombinaci s jiným triážovým markerem) by mohla být vhodná pro detekci CIN3+ lézí a doplnění metylační analýzy.[208]

Kromě metylačního markeru byla miRNA analýza porovnávána i s konvenční cytologickou triážovou metodou, Pap testem. Pro studii, zahrnující 1021 HPV-pozitivních žen, bylo vybráno pro primární analýzu 6 miRNA, z nichž signifikantní deregulaci exprese vykazovaly miRNA-424, miRNA-375, miRNA-34a a miRNA-218. V porovnání s CIN1 a normální cytologií byla exprese těchto miRNA u CIN2+ významně snížena. Detekce miRNA-424 a miRNA-375 vykazovala vyšší sensitivitu (76% a 74,9% vs 63,8% Pap test), vyšší NPV (85,7% a 85,4% vs. 79,3 Pap test) a srovnatelnou specifitu při záchytu CIN2+. Stejně kvalitních výsledků bylo dosaženo i při záchytu CIN3+. Ještě lepších výsledků, než poskytovala detekce jednotlivých miRNA nebo Pap test, bylo dosaženo použitím panelových miRNA testů - miRNA-424/miRNA-375/miRNA-218 pro CIN2+ (sensitivita 74,4 %, specifita 85,3 %, PPV 73,4 % a NPV 86,0 %) a miRNA-424/miRNA-375 pro CIN3+ (sensitivita 78,1 %, specifita 79,8 %, PPV 50,8 % a NPV 93,2 %).[193]

V. CÍL PRÁCE

Se zaváděním primárního HPV screeningu do národních cervikálních screeningových programů vyvstává potřeba triážových testovacích metod, jejichž úkolem je detekce cervikálních intraepiteliálních lézí a predikce rizika rozvoje cervikálního karcinomu. Jedním z definovaných cílů této diplomové práce je vypracování literární rešerše, zaměřené na infekci lidským papilomavirem a současně využívané metody v rámci cervikálního screeningu.

Hlavním cílem experimentální práce bylo srovnání HPV pozitivity u gynekologem odebraných cervikálních stěrů a cervikovaginálních stěrů, odebraných pomocí samoodběrové sady. Dalším cílem byla analýza exprese vybraných miRNA u těchto stěrů a její srovnání s dostupnými tirážovými markery. Určení profilu miRNA, jejichž exprese je v důsledku rozvoje cervikálních intraepiteliálních lézí a cervikálního karcinomu deregulovaná, by mohlo pomoci ke spolehlivému třídění pacientek s pozitivním screeningovým testem, včasné detekci CIN a predikci rizika následného přechodu v cervikální karcinom.

VI. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. HPV screening

Vzorky odebrané pro účely HPVPro Study: Comparison of HPV Detection in Clinician-collected Cervical Swabs and Self-sampled Cervicovaginal Swabs (HPVPro, NCT04133610) byly využity v rámci této diplomové práce pro primární HPV screening, na jehož základě byly vybírány vzorky pro testování miRNA profilu. Pro HPV screening bylo využito dvou různých screeningových testů – Hybrid Capture 2 a QIAscreen.

1.1. Materiál a přístrojové vybavení

- digene Specimen Transport Medium (STM, QIAGEN, Cat. No. 5128-1220), PreservCyt médium (Hologic®), Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV DNA Test (HC2; QIAGEN, Cat. No. 5197-1330), QIAscreen HPV PCR Test (QIAGEN, Cat. No. 617005)
- stolní centrifuga (Eppendorf), Thermomixer R (Eppendorf), luminometr DML 2000™ (Digene), laminární box Herasafe KS (Thermo Fisher Scientific)

1.2. Pacientské stěry

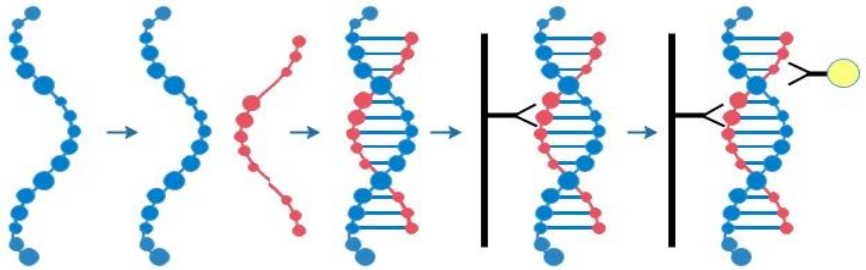
V rámci prvního ramene HPVPro studie bylo odebráno celkem 544 párových stěrů – 544 gynekologem odebraných cervikálních stěrů a 544 cervikovaginálních stěrů odebraných samoodběrem. Jak gynekologické, tak samoodběrové stěry, byly odebírány pomocí odběrové sady Digene HC2 DNA Collection Device (Qiagene). Odběrové kartáčky byly ponořeny a uchovávány v 1 ml STM média. Z celkového objemu 1 ml bylo 100 µl využito pro izolaci celkové RNA z buněčné pelety, 100 µl pro test QIAsure a 800 µl pro HC2 HPV DNA screeningový test.

Do druhého ramene studie HPVPro, bylo zařazeno celkem 500 párových vzorků. Cervikální stěry byly odebírány pomocí odběrové sady Cervex-Brush (Rovers Medical Devices). Samoodběrové stěry byly získány pomocí odběrové sady Evalyn Brush (Rovers Medical Devices). Odběrové kartáčky z cervikálních stěrů byly ponořeny a transportovány ve 20 ml PreservCyt média. Z celkového objemu 20 ml byly využity 2 ml pro izolaci celkové RNA z buněčné pelety, 4 ml pro HC2 HPV DNA screeningový test, 250 µl pro QIAscreen test a 1 ml pro test QIAsure. Samoodběrové sady byly transportovány bez média, po přijetí byl buněčný materiál suspendován ve 3 ml pufru

PBS (phosphate-buffered saline), z něhož byl 1 ml použit pro HC2 HPV DNA screeningový test, 300 µl pro QIAscreen test, 200 µl pro test QIAsure, 300 µl pro izolaci celkové RNA z buněčné pelety.

1.3. Hybrid Capture® 2

HC2 je hybridizační DNA test, založený na chemiluminiscenční kvalitativní detekci 13 vysoce rizikových HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) a 5 nízko rizikových HPV (HPV 6, 11, 42, 43, 44). Pro detekci virové DNA je využíváno specifických RNA sond, které jsou po hybridizaci s cílovou DNA sekvencí zachyceny pomocí RNA:DNA specifických protilátek. Tyto protilátky jsou imobilizovány na stěnách jamek detekční mikrodestičky. Zachycené RNA:DNA hybridy následně reagují s protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou. Konjugovaná alkalická fosfatáza štěpí chemiluminiscenční substrát za současného vyzáření světla, které je přístrojově detekováno (obrázek 19).[209]



Obrázek 19: Průběh HC2 HPV DNA testu – po denaturaci ssDNA (modrá) hybridizuje se specifickou RNA sondou (červená), vzniklý RNA:DNA hybrid je imobilizován pomocí specifických protilátek a značen další protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (žlutá).

Pro denaturaci byl napipetován přesný objem denaturačního činidla (tabulka 1) do všech pacientských vzorků, negativního kalibrátoru, kalibrátoru pro nízko rizikové HPV typy, kalibrátoru pro vysoce rizikové HPV typy a kontroly pro nízko rizikové a pro vysoce rizikové HPV typy. Denaturační činidlo bylo před použitím upraveno přidáním indikačního fialového barviva. Směs ve zkumavkách byla zvortexována a denaturována po dobu 45 minut ve vodní lázni při teplotě 65 °C.

	Objem denaturačního činidla
Negativní kalibrátor	1000 µl
Kalibrátor pro hrHPV a lrHPV	500 µl
Kontrola kvality pro hrHPV a lrHPV	500 µl
Pacientský stěr	400 µl

Tabulka 1: Objemy denaturačního činidla

Pro hybridizaci bylo napipetováno 75 µl negativního kalibrátoru (3 jamky), kalibrátoru pro hrHPV (3 jamky), kontroly kvality pro hrHPV (1 jamka), kontroly kvality pro lrHPV (1 jamka) a denaturovaného vzorku na dno hybridizační mikrodestičky. Po dopipetování všech jamek byla destička zakryta a inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě (20-25 °C). Po deseti minutách bylo do každé jamky přidáno 25 µl hrHPV sondy, ředěné podle potřeby v poměru 1:25. Po přidání sondy do všech jamek byla destička protřepána při 1100 ot./min po dobu 2 minut. Jamky, obsahující kalibrátor pro hrHPV, kontrolu kvality pro hrHPV a vzorky, by měly po protřepání změnit barvu na žlutou. V případě, že v některých jamkách nedošlo ke změně zbarvení, bylo přidáno dalších 25 µl hrHPV sondy a třepání bylo opakováno. Mikrodestička byla následně inkubována v předehřátém ohřívači mikrodestiček při teplotě 65 °C po dobu 60 minut.

Po dokončení hybridizace byl veškerý obsah (100 µl) z hybridizační mikrodestičky přepipetován za použití 8-kanálové pipety do odpovídajících jamek imobilizační destičky. Imobilizační destička byla zakryta a protřepána na rotační třepačce při 1100 ot./min po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace byla imobilizační destička vyprázdněna otočením a vyklepnutím do výlevky tak, aby nedošlo ke zpětnému rozstříknutí kapaliny do imobilizační destičky a kontaminaci vzorků. Pro úplné vysušení byla destička blotována na papírové utěrky.

Detekce imobilizovaného RNA:DNA hybridu byla v prvním kroku provedena přidáním 75 µl detekční reagencie I do každé jamky imobilizační destičky (tabulka 2). Po přidání detekční reagencie I byla destička překryta folií a ponechána inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 30-45 minut. Následně byla destička vyprázdněna nad výlevkou, do sucha blotována, 6x promyta promývacím pufrem, a nakonec opět blotována do úplného vyschnutí.

Počet jamek/stripů	Detekční reagencie I
96/12	12 ml
72/9	7 ml
48/6	5 ml
24/3	3 ml
1	0,125 ml

Tabulka 2: Objem detekční reagencie I nebo II pro detekci RNA:DNA hybridu pro různé počty vyšetřovaných vzorků.

Nakonec bylo do každé jamky přidáno 75 µl detekční reagencie II, mikrodestička byla překryta novou fólií a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě bez přístupu přímého světelného záření. Vyhodnocení HC2 HPV DNA testu bylo provedeno pomocí luminometru DML 2000™ (Digene) podle níže uvedených kritérií (tabulka 3).

Kritéria správného testování	
Variační koeficient negativní kontroly	≤25 %
Variační koeficient kalibrátoru hrHPV	≤15 %
Negativní kontrola	10 ≤ NK RLU ≤ 250
Kalibrátor pro hrHPV/negativní kontrola	2-15 RLU
hrHPV test	kontrola kvality pro lrHPV < 1 RLU kontrola kvality pro hrHPV = 2-8

Tabulka 3: Kritéria pro správně provedené vyhodnocení testování

1.4. QIAscreen HPV PCR Test

QIAscreen je *in vitro* real-time PCR screeningový test, který detekuje přítomnost E7 genu patnácti vysoce rizikových nebo pravděpodobně vysoce rizikových typů HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68). Kromě kvalitativní analýzy je, díky možnosti využití až čtyř fluorescenčních barviv, tento test schopen i částečné genotypizace. QIAscreen odděleně detekuje přítomnost HPV 16, HPV 18 a soubor zbylých 13 HPV typů. V konkurenčních real-time PCR esejích (př. Abbott RealTime High Risk (HR) HPV Assay) je využíváno např. detekce (GP5+/6+) L1 regionu,[210] který může být při integraci virového genomu narušen, což může mít za následek falešně negativní výsledek. Velkou výhodou QIAscreen testu je detekce E7 genu, který nebývá při integraci HPV ovlivněn.[211,]

Ve druhé části studie bylo kromě testu Hybrid Capture 2 využito QIAscreen HPV PCR Testu (QIAGEN, Cat. No. 617005) pro srovnání citlivosti jednotlivých testů v rámci

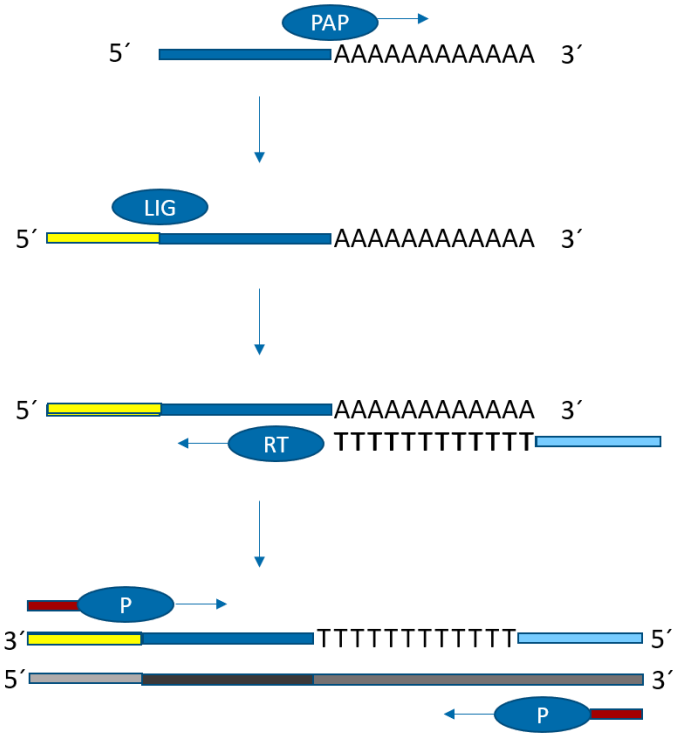
primárního screeningu. Rutinní testování pomocí QIAscreen testu bylo provedeno laboranty Lucií Továrkovou a Tomášem Pospíšilem.

2. Určení miRNA profilu

Pro určení miRNA exprese bylo využito real-time PCR, pro kterou byla připravena cDNA. Cílová sekvence cDNA byla syntetizovanou na základě celkové RNA, izolované z pacientských vzorků.

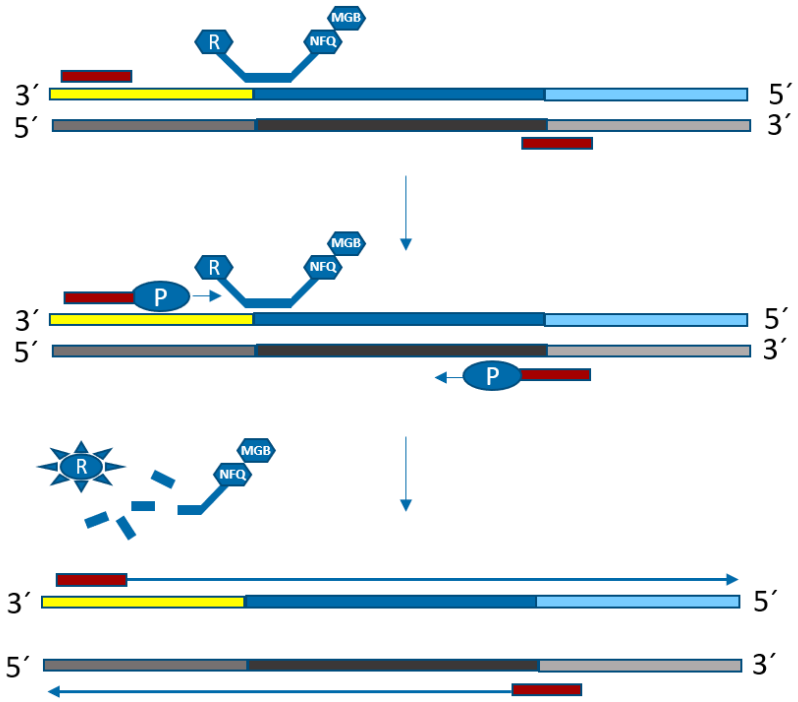
Příprava cDNA templátu byla zprostředkována reverzní transkripcí, při které docházelo k přepisu sekvence RNA do sekvence cDNA. cDNA byla následně amplifikována pro kvantifikaci exprese specifických miRNA pomocí real-time PCR. Příprava cDNA templátu je komplexní proces skládající se ze 4 kroků (obrázek 20):

- **polyadenylace** na 3´-konci pomocí poly(A)-polymerázy
- **ligace adaptoru** na 5´-konci pomoci ligázy
- **reverzní transkripce** pomocí reverzní transkriptázy
- **cDNA amplifikace** pomocí Hot-start DNA-polymerázy



Obrázek 20: Proces přípravy cDNA templátu – polyadenylace, ligace adaptoru, reverzní transkripce, amplifikace cDNA.

Pro analýzu exprese miRNA v cervikálních buňkách bylo využito TaqMan real-time PCR, využívající TaqMan® sondy. TaqMan® sondy jsou oligonukleotidové molekuly, obsahující ve své struktuře reportérové fluorescenční barvivo na 5′ konci (FAM) a nefluorescenční zhášeč na 3′ konci (TAMRA). Tyto sondy jsou při amplifikaci štěpeny díky 5′→3′ exonukleázové aktivitě použité polymerázy a je detekován emitovaný fluorescenční signál.[212,213] TaqMan® sondy dále obsahují MGB strukturu (minor groove binder; např. tripeptid $CDPI_3$), jejíž konjugací na 3′ konci bylo docíleno vyšší teploty tání (T_m) a zvýšení specifity těchto sond.[214,215] Průběh a princip Taq-Man® real-time PCR je znázorněn na obrázku 21.



Obrázek 21: Průběh TaqMan® real-time PCR – v prvním kroku je znázorněno nasednutí specifických primerů (červené) a MGB-TaqMan® sondy; spřežením DNA polymerázy s 5′→3′ exonukleázovou aktivitou a elongací nového vlákna dochází k degradaci sondy a emisi fluorescenčního záření.

2.1. Materiál a přístrojové vybavení

- buněčné pelety z cervikálních stěrů (u ramene A ze 100 µl, u ramene B ze 2 ml media), 1X PBS pufr, QIAzol® lyzační činidlo (Qiagen), chloroform (99,5%, Sigma Aldrich), ethanol (99,8%, Sigma-Aldrich), miRNeasy Mini Kit (Qiagen), TaqMan® Advanced miRNA Assay (Thermo Scientific), TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Cat. No. A28007), TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo

Scientific, Cat. No. 4444556), H2O prostá RNáz, TE pufr (pH 8, Thermo Fisher Scientific), RNasin® Ribonuclease Inhibitors (Promega, Cat. No. N2611)

- chlazená centrifuga (Eppendorf), stolní centrifuga (Smart 12, Hanil Scientific), NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific), Vortex Genie® 2 (Scientific Industries), Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems), mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf), mikrocentrifuga pro PCR stripy (GMClab), Liquid Handler Echo 550 Series (Labcyte Inc.), pipetovací robotická stanice Freedom Evo MultiChannel Arm™ MCA 96 (Tecan), LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

2.2. Izolace RNA

Pro izolaci celkové RNA z buněčných pelet, včetně miRNA, bylo využito guanidin thiokyanát-fenol-chloroformové extrakce pomocí miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Tato metoda byla poprvé popsána v roce 1987 a je založena na rozdělení vzorku mezi dvě nemísitelné fáze – vodnou a organickou, obsahující směs fenolu a chloroformu. DNA je v závislosti na pH přítomna ve vodné fázi společně s RNA nebo v mezifázovém prstenci. Guanidin thiokyanát je přidán jako chaotropní látka pro denaturaci proteinů ve vzorku.[216]

Prvním krokem po rozmražení buněčných pelet, oddělených od supernatantu, bylo promytí pelety 1X PBS pufrem (500 µl), stočení při 2900 ot. po dobu 15 minut a odsátí PBS pufru. Pro lýzu buněk bylo přidáno 1000 µl lyzačního činidla QIAzol® a peleta byla důkladně několikanásobným propipetováním homogenizována. Po uplynutí 5 minut inkubace při laboratorní teplotě bylo přidáno 200 µl chloroformu, směs byla vortexována 15 s, inkubována 2-3 minuty při laboratorní teplotě, a nakonec stočena v předem vychlazené centrifuze při 4 °C, 2900 ot./min a po dobu 15 minut.

Centrifugací fenol-chloroformové směsi došlo k rozdělení směsi mezi 2 fáze – svrchní vodná fáze, obsahující RNA, a spodní organickou fázi s proteiny. DNA byla precipitována v mezifázovém prstenci. Pro další izolaci byla opatrně odebrána horní vodná fáze do nových eppendorfek, byl přidán 100% ethanol v množství 1,5x odebrané vodné fáze a směs byla důkladně promíchána.

Třetí fází izolace celkové RNA z pacientských vzorků bylo nanášení vzorku na centrifugační kolonku, promývání imobilizované RNA soustavou pufrů a její eluce vodou prosté RNáz (RNase free voda) do nové sběrné zkumavky. Podmínky izolace jsou

uvedeny v tabulce 4. Pro dokonalé vymytí RNA z kolonky byla zachycená voda s RNA opět přepipetována ze sběrné zkumavky zpět do kolonky a znovu stočena přes centrifugační kolonu. Koncentrace eluované RNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop® ND-1000.

	Množství	**RCF/min**
Vzorek	max 700 µl / 1 stočení	≥8000 x g / 15 s
RWT pufr	700 µl	≥8000 x g / 15 s
RPE pufr	500 µl	≥8000 x g / 15 s
RPE pufr	500 µl	≥8000 x g / 2 min
Sušení		max RCF / 1 min
Eluce	30 µl	≥8000 x g / 1 min

Tabulka 4: Rozpis přidávaných objemů a podmínek centrifugace.

2.3. Příprava cDNA templátu

Pro polyadenylační reakci byly do 200 µl PCR stripů napipetovány 2 µl vzorku, které byly předem rozmraženy a naředěny na koncentraci 5 ng/µl (ředěné vzorky byly dále uchovávány při -20 °C). Ke 2 µl vzorku byly do každé zkumavky přidány 3 µl polyadenylační směsi, která byla připravena v potřebném množství podle tabulky 5. Program pro polyadenylační reakci byl na termálním cykleru Veriti^{TM} (Applied Biosystems) nastaven podle tabulky 6.

Složka	**1 reakce**	**10 reakcí**
10X Poly(A) pufr	0,5 µl	5,5 µl
ATP	0,5 µl	5,5 µl
Poly(A) enzym	0,3 µl	3,3 µl
RNase free voda	1,4 µl	15,4 µl
RNasin®	0,3 µl	3,3 µl

Tabulka 5: Složení reagencií pro polyadenylační reakci (objemy všech reagencií pro 10 reakcí zahrnují 10% přebytek).

	Teplota	**Čas**
Polyadenylace	37 °C	45 min
STOP reakce	65 °C	10 min
Udržování	4 °C	-

Tabulka 6: Parametry pro nastavení termálního cykleru pro polyadenylační reakci.

Po dokončení polyadenylační fáze bylo ihned přistoupeno na fázi ligace adaptoru. Reakční směs pro ligační reakci byla podle tabulky 7 připravena v potřebném objemu těsně před použitím a rozpipetována do zkumavek (10 µl). Parametry programu pro ligační reakci jsou uvedeny v tabulce 8.

Složka	1 reakce	10 reakcí
5X DNA ligázový pufr	3 µl	33 µl
50% PEG 8000	4,5 µl	49,5 µl
25X Ligační adaptor	0,6 µl	6,6 µl
RNA ligáza	1,5 µl	16,5 µl
RNase free voda	0,4 µl	4,4 µl

Tabulka 7: Složení reagencií pro ligační reakci (objemy všech reagencií pro 10 reakcí zahrnují 10% přebytek).

	Teplota	Čas
Ligace	16 °C	60 min
Udržování	4 °C	-

Tabulka 8: Parametry pro nastavení termálního cykleru pro ligační reakci.

Do zkumavek bylo následně přidáno 15 µl RT reakční směsi, která byla připravena podle rozpisu v tabulce 9. Parametry programu pro RT byly nastaveny podle tabulky 10.

Složka	1 reakce	10 reakcí
5X RT pufr	6 µl	66 µl
dNTP Mix (25mM)	1,2 µl	13,2 µl
20X Univerzální RT primer	1,5 µl	16,5 µl
10X RT Enzymový mix	3 µl	33 µl
RNase free voda	3,3 µl	36,3 µl

Tabulka 9 : Složení reagencií pro reverzní transkripci (10% přebytek zahrnut).

	Teplota	Čas
Reverzní transkripce	42 °C	15 min
STOP reakce	85 °C	5 min
Udržování	4 °C	-

Tabulka 10: Parametry pro nastavení termálního cykleru pro reverzní transkripci.

Pro miR-Amp reakci byly použity nové PCR stripy, do kterých bylo napipetováno 45 µl miR-Amp směsi na jednu zkumavku. Tato reakční směs byla připravena podle rozpisu reagencií v tabulce 11. Do zkumavek s 45 µl miR-Amp směsi bylo přidáno 5 µl produktu reverzní transkripce (celkový objem tak činil 50 µl). Parametry programu pro amplifikaci jsou uvedeny v tabulce 12. Takto získaná amplifikovaná cDNA byla ihned využita pro následnou real-time PCR nebo byla nezředěná uchována, stejně jako produkt reverzní transkripce, při -20 °C.

Složka	1 reakce	10 reakcí
2X miR-Amp Master mix	25 µl	275 µl
20X miR-Amp Primer mix	2,5 µl	27,5 µl
RNase free voda	17,5 µl	192,5 µl

Tabulka 11: Složení reagencií pro amplifikaci cDNA (10% přebytek zahrnut).

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95 °C	5 min	1
Denaturace	95 °C	3 sek	14
Annealing/elongace	60 °C	30 sek	
STOP reakce	99 °C	10 min	1
Udržování	4 °C	-	1

Tabulka 12: Parametry pro nastavení termálního cykleru pro amplifikaci cDNA.

2.4. TaqMan Advanced miRNA Assay

Pro profilování exprese miRNA bylo na základě odborné literatury vybráno celkem 15 miRNA, jejichž deregulace byla detekována v případě cervikálních intraepiteliálních lézí a cervikálních karcinomů. Z těchto 15 miRNA byly 4 miRNA down-regulované a 11 up-regulovaných (tabulka 13).[197,196] Jako endogenní kontrola byl použit referenční gen pro hsa-miR-423-3p.[217]

Up-regulované miRNA	Down-regulované miRNA
hsa-miR-9-5p	hsa-miR-34a-5p
hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-218-5p
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-29a-3p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-125b-5p
hsa-miR-31-3p	
hsa-miR-93-5p	
hsa-miR-21-5p	

hsa-miR-10a-5p	
hsa-miR-16-5p	
hsa-miR-106a-5p	
hsa-miR-222-3p	

Tabulka 13: miRNA, u nichž byla popsána změna exprese v případě rozvoje cervikálních intraepiteliálních lézí a cervikálního karcinomu

Pro určení exprese miRNA v pacientských stěrech bylo využito cDNA, připravené v předešlých krocích, která byla před použitím čerstvě ředěna v poměru 1:10 0,1X TE pufrem. Testovací PCR reakce byly provedeny v 96 jamkových deskách s celkovým objemem reakční směsi 20 µl. PCR mix byl připraven podle tabulky 14 a rozpipetován po 15 µl do příslušných jamek 96 jamkové desky. K 15 µl PCR reakčního mixu v každé jamce bylo přidáno 5 µl cDNA (1:10). Negativní kontrola obsahovala 15 µl PCR mixu a 5 µl 0,1X TE pufru. Po rozpipetování všech komponent byla destička překryta adhezivní folií a spuštěna PCR reakce na přístroji LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Parametry real-time q-PCR reakce byly nastaveny podle tabulky 15.

Složka	1 reakce
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µl
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)	1 µl
RNase-free voda	4 µl

Tabulka 14: Složení PCR mixu pro jednu reakci (96 jamkové desky)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95 °C	30 s	1
Denaturace	95 °C	10 s	50
Annealing/Elongace	60 °C	40 s	

Tabulka 15: Parametry programu real-tiume PCR

Pomocí testovacích reakcí na souboru sedmi vzorků byla zkoumána možnost použití referenční miRNA-423-3p (pro endogenní kontrolu) a dále všech patnácti vybraných miRNA. Na základě testovacích PCR reakcí pro každou z patnácti vybraných miRNA bylo pro další analýzu vybráno 5 miRNA (miRNA-16-5p, miRNA-20a-5p, miRNA-20b-5p, miRNA-34a-5p, miRNA-93-5p). Pro analýzu miRNA byl sestaven finální soubor 127 gynekologických cervikálních stěrů podle podmínek v tabulce 16, přičemž nejdříve byly vybrány všechny vzorky s ASC-US+ cytologií a hrHPV+/-, které

byly doplněny skupinou hrHPV+/NILM vzorků. Pro real-time q-PCR reakci byly použity 384 jamkové desky, každý vzorek byl testován v triplikátu. Triplikát negativní kontroly obsahoval 0,1X TE pufr.

Cytologie	HPV závěr	
	hrHPV poz.	hrHPV neg.
≥ ASC-US	+	+
NILM	+	-

Tabulka 16: Kritéria výběru vzorků pro analýzu miRNA exprese

Pomocí liquid handleru Echo 550 Series (Labcyte Inc.) bylo z 384 jamkové desky s naředěnou cDNA (1X negativní kontrola) přeneseno 2,5 µl cDNA do nové 384 jamkové desky. Během transferu cDNA do nové desky byl připraven PCR mix a rozpipetován po 38 µl do celé 96 jamkové desky. K 2,5 µl cDNA bylo z 96 jamkové desky přidáno pomocí pipetovací robotické stanice Freedom Evo MultiChannel Arm™ MCA 96 (Tecan) 7,5 µl připraveného PCR mixu (tabulka 17). Celkový objem reakční směsi v jedné jamce byl 10 µl. Připravená 384 jamková deska s reakční směsí byla vložena do LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Parametry real-time q-PCR byly nastaveny podle tabulky 15.

Složka	1 reakce
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	5 µl
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)	0,5 µl
RNase-free voda	2 µl

Tabulka 17: Složení PCR mixu pro jednu reakci (384 jamkové desky)

3. QIAsure Methylation Test

QIAsure Methylation Test je validovaný komerčně dostupný triážový test, založený na multiplexní kvantitativní metylačně-specifické PCR detekci metylace promotorů tumor supresorových genů FAM19A4 a miR-124-2.[171] Úroveň hypermetylace FAM19A4 a miR-124-2 se zvyšuje s vážností onemocnění děložního hrdla.[218,219] Principem této triážové metody je izolace DNA z pacientských vzorků, která je následně podrobena bisulfitové konverzi a kvantitativní Taq-Man® rt-PCR.[220]

Pro testování bylo využito komerčního QIAsure Methylation Test Kit (Cat. No. 616014), který byl vyhodnocen jako pozitivní v případě hypermethylace alespoň jednoho

ze dvou tumorsupresorů dle doporučení výrobce. Rutinní testování bylo provedeno dle návodu k použití laborantem Tomášem Pospíšilem.

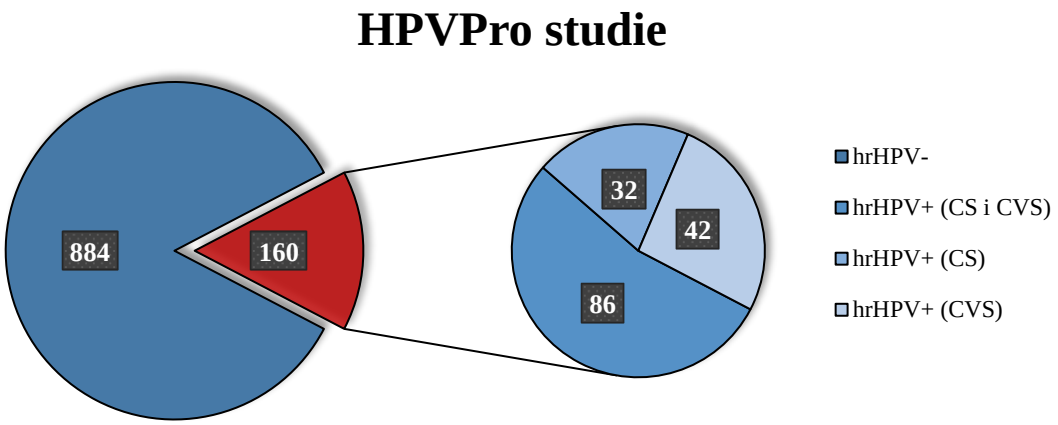
4. Statistická analýza

Vzhledem k selhání normalizační miRNA byla pro hodnocení PCR zvolena metoda absolutní kvantifikace pomocí hodnot C_t. Pro porovnání vypočítaných hodnot C_t s HPV závěrem, výsledkem triážového testu QIAsure, hypermetylací FAM19A4 a hypermetylací miR-124-2 byl použit neparametrický Wilcoxonův dvouvýběrový test. Pro porovnání hodnot C_t u skupin HPV+/NILM, HPV+/ASC-US+ a HPV-/ASC-US+ byl použit Kruskal-Wallisův test. Pro porovnání výsledků QIAsure testu s jednotlivými cytologickými nálezy byl použit Fisherův exaktní test. Všechny analýzy byly provedeny ve statistickém softwaru R, verze 3.5.0.

VII. VÝSLEDKY

1. HPV screening

Do studie HPVPro bylo celkově zařazeno 1044 žen, které se účastnily rutinního screeningového vyšetření u gynekologa, byly ve věku 30-65 let, neměly v minulosti přednádorové ani nádorové onemocnění děložního hrdla a podepsaly informovaný souhlas s účastí ve studii. U 160 z těchto žen byla detekována hrHPV pozitivita u cervikálního a/nebo cervikovaginálního stěru. Hr-HPV pozitivita byla tedy nalezena u 15,3 % žen ze screeningové populace (graf 1).



Graf 1: Grafické znázornění souhrnného vyhodnocení HPVPro studie (CS – cervikální stěr, CVS – cervikovaginální stěr, hrHPV+ – pozitivní na přítomnost vysoce rizikového typu lidského papilomaviru, hrHPV- – negativní na přítomnost vysoce rizikového typu lidského papilomaviru)

V rámci ramene A screeningové studie HPVPro bylo analyzováno celkem 544 párových gynekologických cervikálních (CS) a samoodběrových cervikovaginálních stěrů (CVS) pomocí Hybrid Capture 2 HPV testu. Výsledná hrHPV pozitivita byla nalezena celkově u 87 žen (hrHPV+ CS i/nebo CVS), což odpovídá 16,0 % ze screeningové populace. Z 87 hrHPV pozitivních výsledků bylo 26 párových vzorků pozitivních pouze u CVS a 11 párových vzorků vykazovalo pozitivitu pouze u CS (tabulka 18).

V rámci ramene B studie HPVPro bylo testováno 500 žen s párovými gynekologickými a samoodběrovými vzorky pomocí dvou metod – Hybrid Capture 2 a QIAscreen. Pomocí HC2 screeningového testu bylo vyhodnoceno jako hrHPV+ celkem 73 pacientek, z nichž 16 párových vzorků bylo pozitivních pouze u CVS a 21 párových vzorků bylo pozitivních pouze u CS. Testem QIAscreen bylo hrHPV+ vyhodnoceno

pouze 56 žen. U 9 žen byla hrHPV pozitivita nalezena pouze u CVS a u 5 pacientek byla hrHPV pozitivita detekována pouze u CS (tabulka 18).

CS	CVS	Celkem (A+B)	Rameno A	Rameno B	
		HC2	HC2	HC2	QIAscreen
hrHPV+	**hrHPV+**	86/1044 (8,24%)	50/544 (9,19%)	36/500 (7,2%)	42/486 (8,6%)
hrHPV+	**negativní**	32/1044 (3,07%)	11/544 (2,02%)	21/500 (4,2%)	5/486 (1,03%)
negativní	**hrHPV+**	42/1044 (4,02%)	26/544 (4,78%)	16/500 (3,2%)	9/486 (1,9%)
negativní	**negativní**	884/1044 (84,7%)	457/544 (84,0%)	427/500 (85,4%)	430/486 (88,5%)
Celkem hrHPV+ (CS i/nebo CVS)		160/1044 (15,3%)	87/544 (16,0%)	73/500 (14,6%)	56/486 (11,5%)
Shoda Cs a CVS		970/1044 (92,9%)	507/544 (93,2%)	463/500 (92,6%)	472/486 (97,1%)

Tabulka 18: Souhrnné vyhodnocení HPVPro studie

Celková konkordance detekce HPV u cervikálních a cervikovaginálních stěrů byla u hybridizačního HC2 HPV testu nalezena u 970 párových vzorků, což odpovídá výsledné 92,9% shodě. HrHPV pozitivita byla pomocí testu HC2 častěji detekována u cervikovaginálních stěrů v porovnání se stěry cervikálními (128 versus 118).

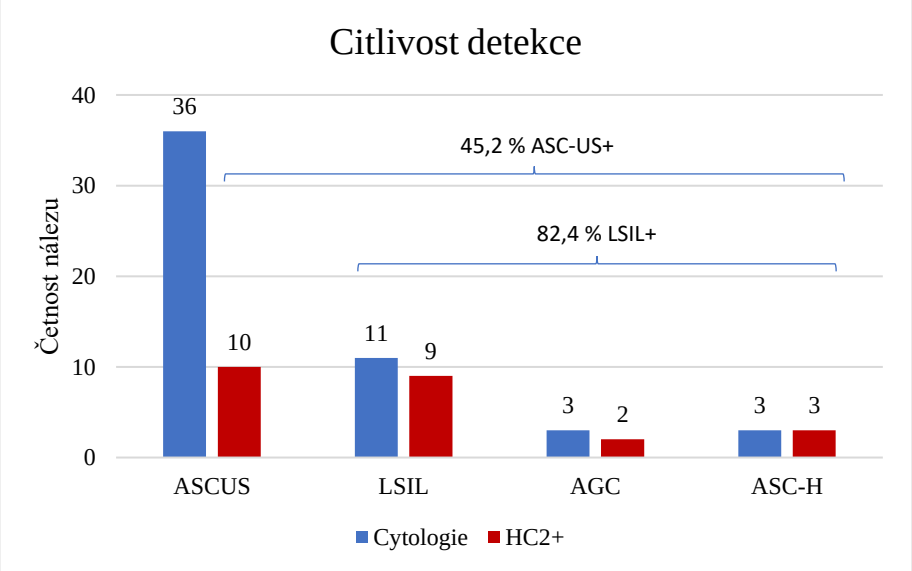
V případě PCR testu QIAscreen, který byl zařazen až v druhé části HPVPro studie a byl vyhodnocen u 486 vzorků, byla konkordance o 4-5% vyšší v porovnání s dílčí i celkovou konkordancí HC2 HPV testu. Pomocí QIAscreen HPV testu tak bylo vyhodnoceno se shodným výsledkem celkem 472 párových vzorků, což odpovídá 97,1% shodě. Dílčí hrHPV pozitivita u CS a CVS, vykazovala pomocí PCR metody QIAscreen podobný trend jako u metody HC2. Hr-HPV pozitivita byla častěji detekována u cervikovaginálních v porovnání s cervikálními stěry (51 versus 47 žen).

Při odběru cervikálního stěru byl u všech pacientek (n=1044) odebrán i vzorek pro cytologické vyšetření, které bylo provedeno v CGB laboratoři v Ostravě. Pomocí HC2 testu bylo na základě hrHPV-pozitivity v cervikálních vzorcích detekováno celkem 118 hrHPV pozitivních vzorků. Výsledky cytologického vyšetření jsou ve vztahu k hrHPV pozitivitě zaznamenány v tabulce 19. Celkem bylo cytologickým vyšetřením vyhodnoceno 990 vzorků s normálním nálezem bez intraepiteliálních lézí a malignit (NILM), 36 vzorků s nálezem atypický skvamózní epitel nejasného původu (ASC-US),

11 vzorků s lehkými intraepiteliálními lézemi (LSIL), 3 vzorky s nálezem atypie žlázových buněk (AGC) a 3 vzorky s nálezem atypický skvamózní epitel high-grade léze nelze vyloučit (ASC-H). Při použití HC2 testu jako primárního screeningu by tak bylo detekováno celkem 45,2 % (24/53) případů s cytologickým závěrem ASC-US+. Diagnózy LSIL+ by bylo pomocí HC2 v cervikálních stěrech možné detekovat celkem u 82,4 % (14/17) vzorků (graf 2). Citlivost detekce nálezů LSIL+ v rameni A HPVPro studie (odběrová sada Digene HC2 DNA Collection Device (Qiagene)) byla 70 %. V rameni B (odběrová sada Cervex-Brush (Rovers Medical Devices)) byla citlivost záchytu LSIL+ 100 %.

Cytologie	Rameno A (CS)		Rameno B (CS)		Celkem
	HC2 pozitivní	HC2 negativní	HC2 pozitivní	HC2 negativní	
NILM	49	459	45	437	990
ASCUS	5	20	5	6	36
LSIL	4	2	5	-	11
AGC	1	1	1	-	3
ASC-H	2	-	1	-	3
Nelze vyšetřit	-	1	-	-	1
Celkem	61	483	57	443	1044

Tabulka 19*: Výsledky cytologického vyšetření, uspořádané do skupin podle HC2 závěru*



Graf 2: Grafické vyjádření celkové citlivosti HC2 testu pro záchyt ASC-US+ a LSIL+ cytologických nálezů v cervikálních stěrech.

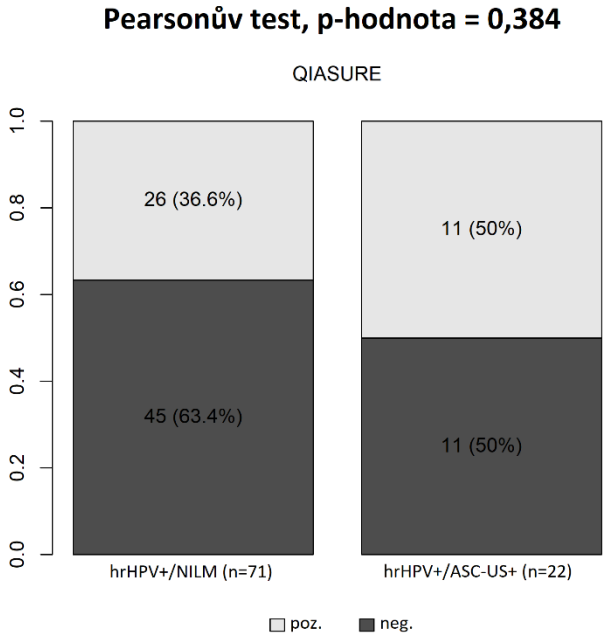
V druhé části HPVPro studie (Rameno B, n=500) byly cervikální stěry testovány, kromě HC2 hrHPV testu, i PCR metodou QIAscreen. Výsledky cytologického vyšetření jsou v tabulce 20 zaznamenány v závislosti na HPV závěru pomocí HC2 a QIAscreen testu. Pomocí HC2 testu bylo detekováno 66,7 % (12/18) vzorků s cytologickým závěrem ASC-US+, respektive 100 % vzorků s nálezem LSIL+. QIAscreen testem bylo detekováno 61,1 % (11/18) ASC-US+, respektive 85,7 % (6/7) LSIL+ vzorků.

Cytologie	**Cervikální stěr (CS)**					**Celkem**
	HC2 pozitivní	**HC2 negativní**	**QIAscreen pozitivní**	**QIAscreen negativní**	**QIAscreen selhal**	
NILM	45	437	36	444	2	482
ASCUS	5	6	5	6	-	11
LSIL	5	-	4	1	-	5
AGC	1	-	1	-	-	1
ASC-H	1	-	1	-	-	1
Celkem	57	443	47	451	2	500

Tabulka 20: Výsledky cytologického vyšetření u vzorků z Ramene B, uspořádané do skupin podle závěru HC2 a QIAscreen testu

2. QIAsure metylační test vs. cytologické vyšetření

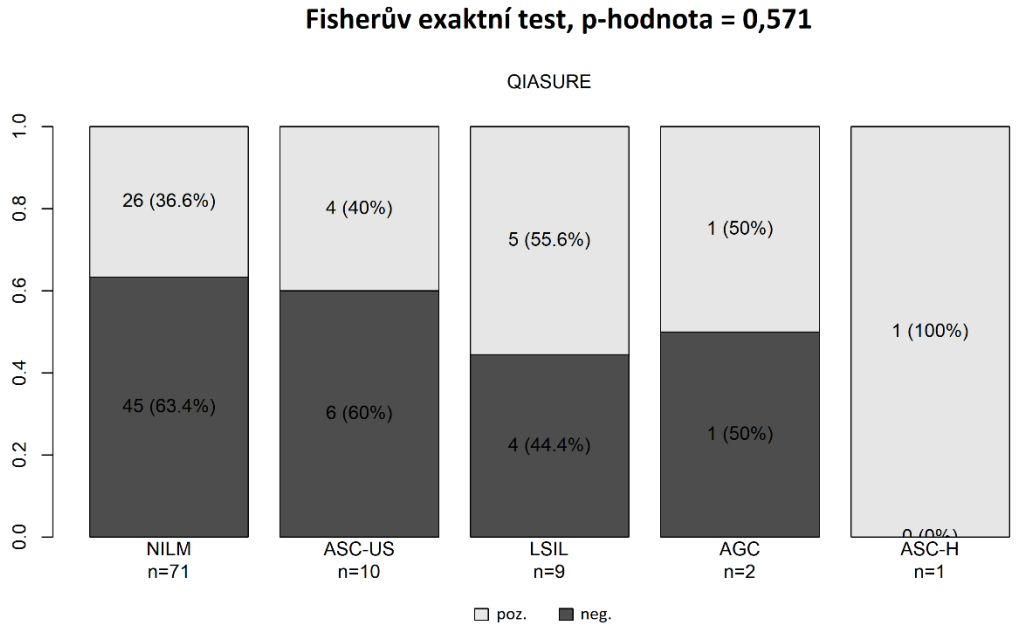
Pomocí QIAsure metylačního triážového testu byla analyzována hypermetylace promotorů tumor supresorových genů FAM19A4 a miR-124-2 u hrHPV-pozitivních pacientek (n=93). U souboru pacientských vzorků pro QIAsure analýzu byl stanoven a klasifikován cytologický nález podle Bethesda systému – NILM (n=71), ASC-US (n=10), LSIL (n=9), AGC (n=2), ASC-H (n=1). Cytologické nálezy byly porovnány s celkovými i dílčími výsledky QIAsure testu – FAM19A4/miR-124-2, FAM19A4 a miR-124-2 (graf 3-6).



Graf 3: Porovnání pozitivity QIAsure testu s obecným vyhodnocením cytologického vyšetření – normální (NILM)/abnormální cytologický nález (ASC-US+).

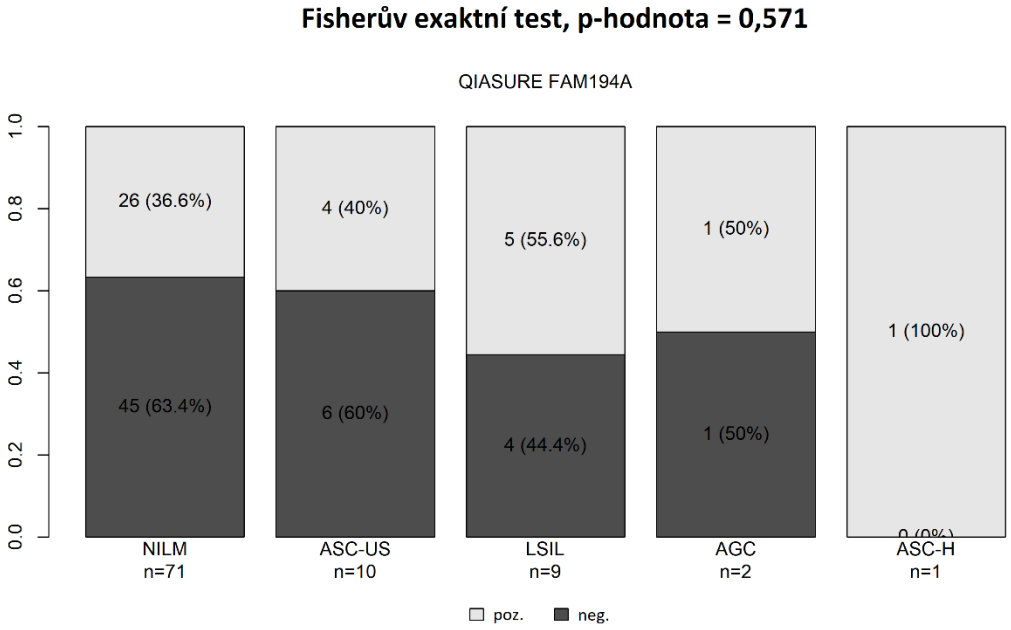
Z kompletního vyhodnocení testu QIAsure a porovnání s cytologickými nálezy vyplývá, že z celkových 71 vzorků s normálním cytologickým nálezem (NILM) bylo pomocí QIAsure testu shodně, tedy s negativním výsledkem, vyhodnoceno celkem 45 vzorků (63,4 %). Zbylých 26 vzorků (36,3%) mělo pozitivní výsledek metylačního testu alespoň u jednoho ze sledovaných markerů, což indikuje možnou přítomnost nebo vyšší riziko rozvoje prekancerózních lézí a cervikálního karcinomu v následujícím období.[169] V souboru hrHPV-pozitivních vzorků se současným abnormálním cytologickým nálezem (n=22) byla pozitivně testována pouze polovina vzorků (graf 3).

Na grafu 4 jsou znázorněny výsledku metylační analýzy QIAsure ve vztahu ke konkrétním cytologickým nálezům u hrHPV-pozitivních pacientek. Pozitivní QIAsure test byl detekován u 6 vzorků s cytologickým nálezem ASC-US, 4 vzorků s nálezem LSIL. Pozitivní výsledek hypermetylace FAM19A4/miR-124-2 byl detekován u 1 vzorku s nálezem AGC i u jediného vzorku s nálezem ASC-H (graf 4). Vzorky s cytologickým nálezem HSIL+ se ve screeningové populaci nevyskytovaly.

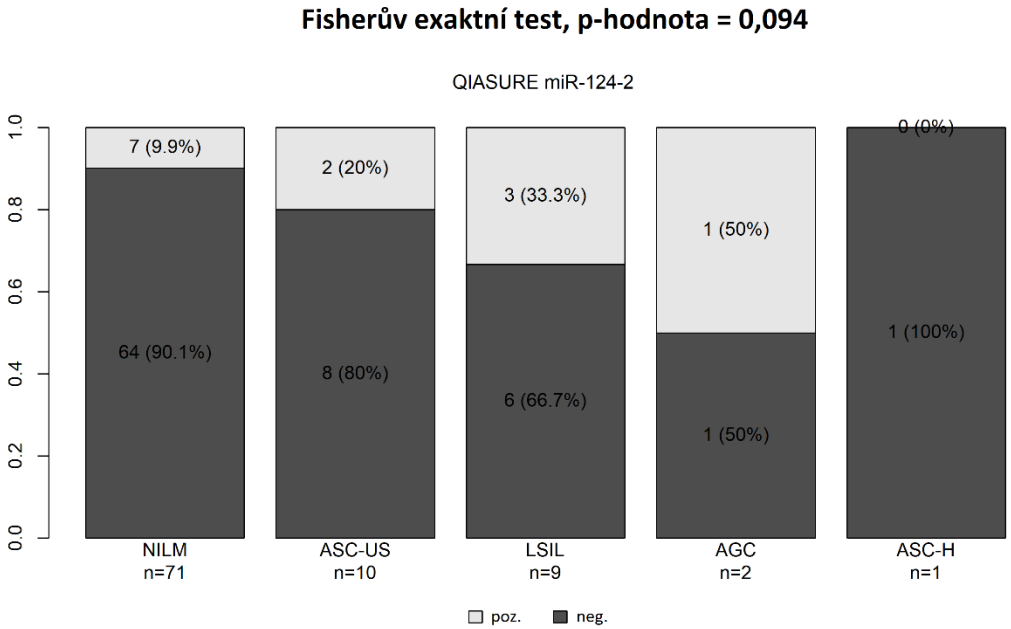


Graf 4:Porovnání výsledků QIAsure (poz./neg.) s konkrétními cytologickými nálezy – NILM, ASC-US, LSIL, AGC a ASC-H.

V případě výsledků metylační analýzy jednotlivých genů byla metylace FAM19A4 pozitivně testována u stejného počtu pacientských vzorků, jako byl celkový závěr QIAsure metylačního testu (graf 5). V porovnání s analýzou metylace FAM19A4 vykazovala metylační analýza promotoru miR-124-2 nižší pozitivitu u skupiny s nálezem NILM a všech skupin s abnormálním cytologickým nálezem, kromě skupiny s nálezem AGC (graf 6). Ve skupině abnormálních cytologických nálezů tak metylace miR-124-2 vykazuje nižší pozitivitu v porovnání s metylační analýzou FAM19A4.



Graf 5: Porovnání výsledků hypermetylace FAM19A4 s cytologickými nálezy



Graf 6: Porovnání výsledků hypermetylace miR-124-2 s cytologickými nálezy

3. MiRNA analýza

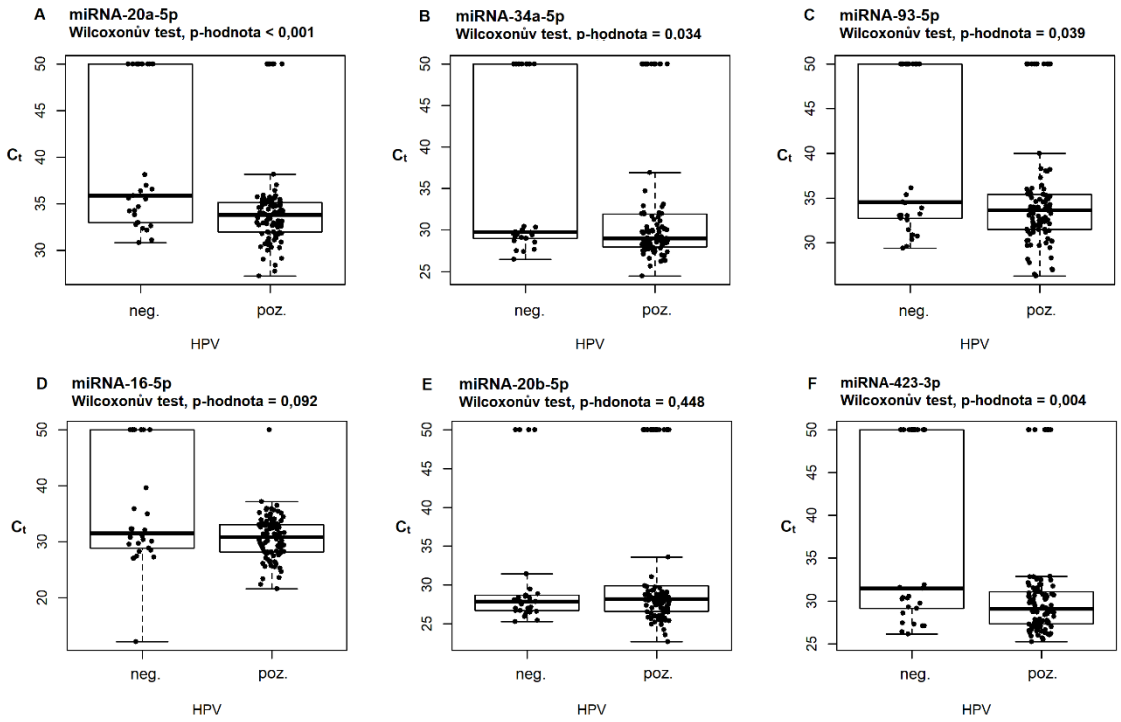
Exprese miRNA byla analyzována na souboru 127 vzorků získaných z cervikálních gynekologických stěrů. Soubor těchto vzorků obsahoval skupinu hrHPV-pozitivních vzorků s abnormální cytologií (n=23), hrHPV-pozitivních vzorků s normálním cytologickým nálezem bez intraepiteliálních lézí a malignit (n=75) a skupinu hrHPV-negativních vzorků s abnormálním cytologickým nálezem (n=29).

Míra exprese konkrétních miRNA u cervikálních gynekologických stěrů byla porovnávána se samotnými výsledky screeningového testu na přítomnost hrHPV a následně s výsledky cytologického vyšetření. Pro vyhodnocení PCR testů byla původně zvolena metoda relativní kvantifikace. Pro relativní kvantifikaci výsledků byly na základě odborné literatury vybrány dvě normalizační miRNA pro cervikální vzorky – hsa-miR-423-3p a RNU43.[217] Vzhledem k nedostupnosti normalizační RNU43 v TaqMan systému byla pro normalizaci použita pouze hsa-miR-423-3p.

Ze statistické analýzy kompletního souboru 127 vzorků a korelace s výsledky screeningového testu však vyplynulo, že exprese normalizační miRNA-423-3p je pravděpodobně ovlivněna už samotnou přítomností hrHPV (tabulka 21) a není tak vhodná pro normalizaci ostatních testovaných miRNA. U jednotlivých miRNA tak byly hodnoceny absolutní hodnoty C_t. U hrHPV-pozitivních vzorků byla absolutní kvantifikací detekována zvýšená exprese miRNA-423-3p (p=0,004). Podobný trend byl zaznamenán i u dalších 4 testovaných miRNA – miRNA-20a-5p, miRNA-34a-5p, miRNA-93-5p a miRNA-16-5p. Hodnoty exprese jednotlivých miRNA ve vztahu k HPV pozitivitě jsou vyjádřeny formou box-plotů na obrázku 22.

miRNA	**hrHPV**		
	hrHPV neg. (n=29)	**hrHPV poz. (n=98)**	**p-hodnota**
miRNA-20a-5p	35,9 (32,98-50)	33,8 (31,97-35,14)	< 0,001
miRNA-34a-5p	29,8 (28,98-50)	29 (27,95-31,86)	0,034
miRNA-93-5p	34,6 (32,72-50)	33,7 (31,56-35,39)	0,039
miRNA-16-5p	31,5 (28,86-50)	30,9 (28,16-33,07)	0,092
miRNA-20b-5p	27,9 (26,72-28,71)	28,2 (26,69-29,87)	0,448
miRNA-423-3p	31,5 (29,12-50)	29,1 (27,35-31,07)	0,004

Tabulka 21: Absolutní kvantifikace exprese miRNA u hrHPV-pozitivních a hrHPV-negativních vzorků, vyjádřená jako medián C_t (1. kvartil – 3. kvartil)

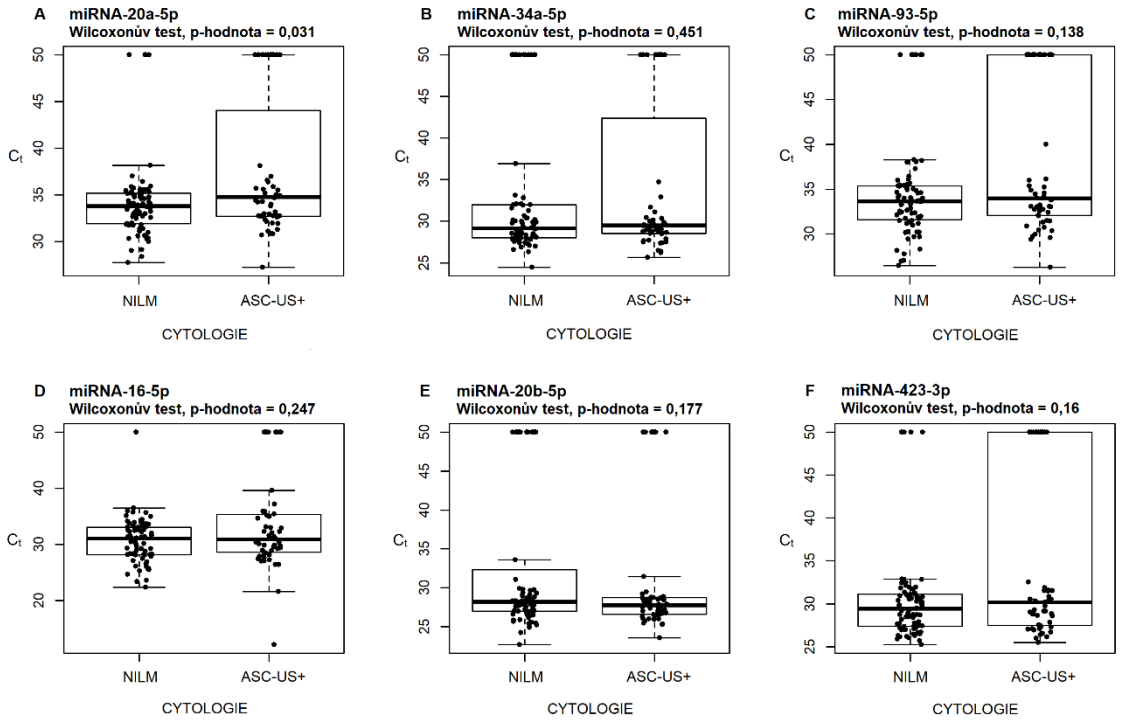


Obrázek 22: Grafické znázornění exprese miRNA v závislosti na hrHPV-pozitivitě. Míra exprese 5 miRNA je signifikantně zvýšena u hrHPV pozitivních vzorků (A, B, C, D, F)

Pro testování možnosti použití miRNA exprese, jako spolehlivého triážového testu v primárním HPV screeningu, byly srovnány výsledky absolutní kvantifikace s výsledky cytologického nálezu (normální/abnormální). Výsledky absolutní kvantifikace miRNA exprese v závislosti na cytologickém nálezu jsou formou mediánu (1. kvartil – 3. kvartil) vyjádřeny v tabulce 22. Porovnáním výsledků analýzy exprese miRNA mezi skupinou s normálním a skupinou s abnormálním nálezem nebyla pozorována žádná významná změna exprese zkoumaných miRNA, vyjma miRNA-20a-5p, u níž byla pozorována nižší exprese u vzorků s abnormálním cytologickým nálezem v porovnání s NILM (obrázek 23).

miRNA	**Cytologie**		**p-hodnota**
	normální (n=75)	**abnormální (n=52)**	
miRNA-20a-5p	33,8 (31,95-35,16)	34,8 (32,73-41,07)	0,031
miRNA-34a-5p	29,2 (28,02-31,96)	29,5 (28,55-38,54)	0,451
miRNA-93-5p	33,7 (31,62-35,39)	34 (32,07-50)	0,138
miRNA-16-5p	31,1 (28,16-33,05)	30,9 (28,77-35,25)	0,247
miRNA-20b-5p	28,2 (27-32,32)	27,8 (26,6-28,74)	0,177
miRNA-423-3p	29,4 (27,4-31,12)	30,2 (27,53-50)	0,16

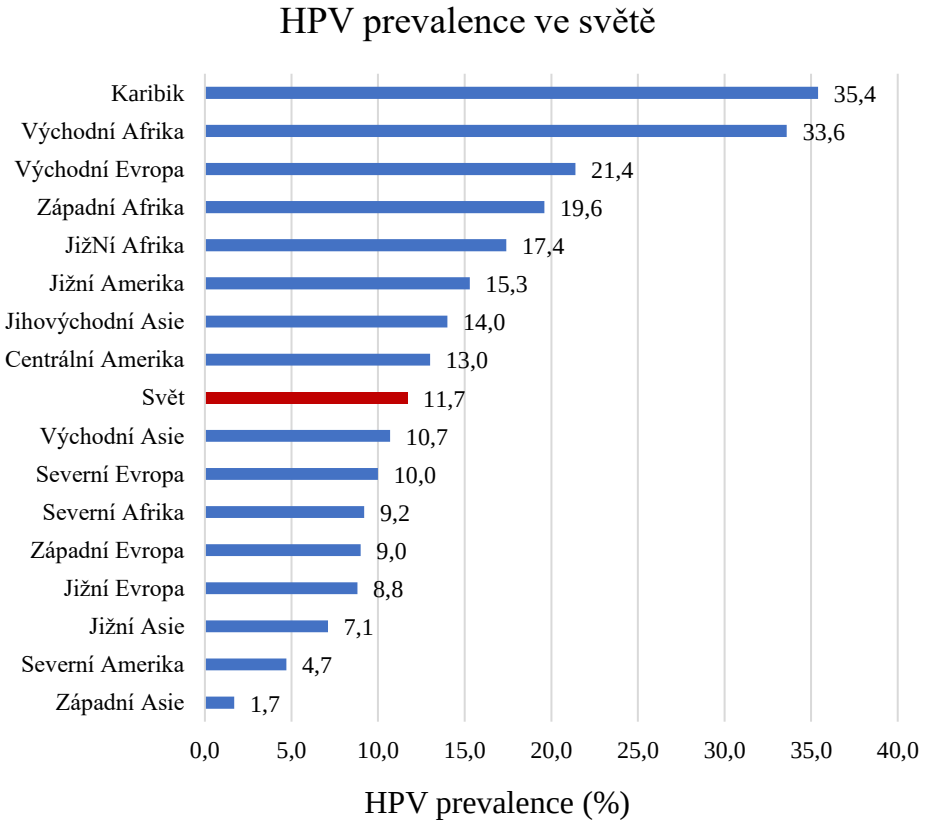
Tabulka 22: Absolutní kvantifikace miRNA exprese u skupiny vzorků s normálním nebo abnormální cytologickým nálezem



Obrázek 23: Grafické vyjádření exprese miRNA v závislosti na normálním nebo abnormální cytologickém nálezu.

VIII. DISKUZE

Všechny vzorky zařazené do této diplomové práce byly získány v rámci HPVPro studie (NCT04133610), jejímž hlavním cílem bylo porovnání HPV pozitivity u párových cervikálních gynekologických stěrů (CS) a cervikovaginálních samoodběrových stěrů (CVS). Dohromady bylo ve dvou ramenech otestováno 1044 pacientek (Rameno A, n=544; Rameno B, n=500). Celkově byla na základě pozitivního screeningového HPV testu alespoň u jednoho stěru z párového vzorku (CS i/nebo CVS) vyhodnocena přítomnost vysoko rizikového typu lidského papilomaviru (hrHPV) u 160 pacientek, což odpovídá 15,3 % z celkové screeningové populace. Námi zjištěná prevalence hrHPV-pozitivity ve screeningové populaci žen (n=1044) je tak nepatrně nižší, než je míra prevalence publikované v jediné studii zaměřené na prevalenci hrHPV v české populaci z roku 2013 (18,2 %, n=1393, HC2 High-Risk HPV DNA test). Tato studie byla nicméně zaměřena na ženy ve věku 14-79 let, v případě výpočtu pro populaci žen ve věku 30-65 let byla v této studii nalezena prevalence hrHPV u 13,5 % žen (95/704).[221] V porovnání s ostatními oblastmi světa je hrHPV prevalence 15,3 % v populaci českých žen vysoká[222], což koreluje s častým výskytem cervikálního karcinomu v České republice.



Obrázek 24: HPV prevalence ve světě – vytvořeno a upraveno podle dat publikovaných meta-analýze z roku 2010[222]

V případě porovnání sensitivity primárního HPV screeningu s klasickým cytologickým cervikálním screeningem je u HPV screeningu dosaženo podstatně vyšší sensitivity. Ve srovnání s cytologií je nižší specifita primárního HPV screeningu způsobena vysokým podílem přechodných (tranzientních) HPV infekcí, které jsou eliminovány bez vzniku prekancerózních lézí či cervikálního karcinomu. Z toho důvodu je nutné doplnit primární HPV screening vhodnou triážovou metodou.[223,224] Pro screeningové testování v první části HPVPro studie byl použit Hybrid Capture 2 High-risk HPV DNA test (HC2), který byl ve druhé části studie doplněn testem QIAscreen HPV PCR test. PCR metoda QIAscreen HPV PCR Test je, stejně jako HC2, plně validována pro použití v primárním HPV screeningu. Pro záchyt HPV pozitivních vzorků s CIN2+ cytologií byla stanovena 97,1% sensitivita a 94,3% specifita. I tento test byl validován jak pro použití u gynekologických odběrů, tak pro testování vzorků odebraných pomocí samoodběrových sad.[211] Obě dvě použité screeningové metody, HC2 High-Risk HPV test i QIAscreen HPV PCR test, splňují obecné vlastnosti pro vhodný screeningový test a jsou použitelné v rámci plošného primárního HPV screeningu.[225] Z výsledků metaanalýzy, publikované v roce 2018, vyplývá, že větší souhrnné absolutní sensitivity pro záchyt CIN2+ je pomocí signál amplifikujících HPV testů dosaženo u specialistou odebraných cervikálních vzorků (93 %) než u samoodběrových vzorků (77 %). PCR metodou bylo dosaženo ekvivalentní sensitivity, stejně tak specifity, pro detekci CIN2+ u gynekologických i samoodběrových vzorků.[226] Pro absenci CIN2+ cytologických nálezů nemohla být v rámci této diplomové práce stanovena citlivost pro záchyt CIN2+ nálezů, jako ve výše diskutovaných studiích. V rámci práce dizertační bude sensitivita a specificita stanovena na základě výsledků histologie, které budou provedeny po dvouletém pozorování. U HC2 testu byla stanovena celková citlivost 82,4 % pro LSIL+.V první části studie byla citlivost HC2 pro LSIL+ 70 %, ve druhé části studie byla zjištěna 100% citlivost u HC2 testu a 87,5% citlivost u QIAscreen testu při záchytu LSIL+ cytologických nálezů. Celková citlivost pro záchyt LSIL+ je nižší, než je uváděna citlivost ve velkých screeningových studiích.[227,228]

Dalším cílem bylo porovnání hrHPV-pozitivity gynekologických a samoodběrových stěrů pro možnost zařazení samoodběrových sad do rutinního screeningového testování. Z několika studií vyplývá, že přímým nabídnutím samoodběrových sad došlo k výraznému navýšení počtu žen, účastnících se cervikálních screeningových programů. Většina dotazovaných žen také uvedla, že použití

samoodběrové sady je pro ně, na základě přiloženého manuálu, jednoduché, pohodlné a preferovali by jej před absolvováním odběrů u specialisty. [229,226,230,231] Shoda v testování hrHPV-pozitivity mezi specialistou odebraným a samoodběrovým vzorkem, u skupiny 153 žen, byla zaznamenána u 86% párových vzorků. Pro záchyt CIN2+ byla stanovena 91% sensitivita a 51% specifita u specialistou odebraných vzorků a 93% sensitivita a 51% specifita u samoodběrových vzorků.[230] V jiné studii, vyšetřující celkem 213 žen, byla publikována 89,2% konkordance mezi samoodběrovými a gynekologickými vzorky.[231] Vyšší konkordance detekce CIN2+ u gynekologických a samoodběrových vzorků byla zjištěna při použití PCR testovacích metod, v porovnání se signál amplifikujícími metodami (HC2).[226] Na několikanásobně větší populaci žen (n=1044), než je uvedeno v předchozích studiích,[230,231] byla analýzou všech párových vzorků zjištěna 92,9% konkordance u testu HC2 a 97,1% u testu QIAscreen. Vyšší konkordance tak bylo dosaženo použitím PCR metody, v porovnání s HC2 testem, stejně jako v metaanalýze Arbyn et al. 2018.

Metylační analýza FAM19A4/miR-124-2 pod názvem QIAsure, je validovaná triážová metoda pro klinické využití v detekci cervikálního karcinomu a prekancerózních lézí u cervikálních i samoodběrových stěrů u hrHPV-pozitivních žen starších 30 let. Negativní výsledek metylační analýzy FAM19A4/miR-124-2 vypovídá o velmi nízkém riziku následného rozvoje cervikálního karcinomu u HPV-pozitivních žen.[169,171] Velkou výhodou při použití metylační analýzy, jako triážového testu v primárním HPV screeningu, je nutnost absolvování pouze jediného cervikálního odběru, který je využit jak pro screeningový test, tak případný triážový test, menší časová náročnost a celkové zkrácení lhůty od odběru po diagnózu.[232] Metylační analýza FAM19A4 i miR-124-2 byla kromě vzájemné kombinace testována i v kombinaci s jinými metylačními markery nebo porovnávána samostatně s jinými triážovými metodami.[232,218,233] Uvedené studie ukazují, že je metylační analýza FAM19A4/mir-124-2 spolehlivou triážovou metodou pro detekci prekancerózních lézí a cervikálního karcinomu u pacientek s HPV-pozitivitou.

Při testování HPV-pozitivních výsledků s normální a abnormální cytologií byl pozitivní QIAsure test detekován u více než třetiny HPV-pozitivních vzorků s normálním cytologickým nálezem. Tato skutečnost by mohla značit počínající rozvoj cervikálních intraepiteliálních lézí u vzorků, které byly cytologickým vyšetřením nedetekovatelné. Ve skupině HPV-pozitivních vzorků s abnormálním cytologickým nálezem byla hypermetylace detekována přesně u poloviny vzorků. Při samostatném porovnání

výsledků metylace markerů (ne v kombinaci) u jednotlivých konkrétních cytologických nálezů je patrné, že metylace FAM19A4 byla pozitivní ve všech QIAsure pozitivních vzorcích, na rozdíl od metylace miR-124-2. Metylace miR-124-2 byla prokázána pouze ve 13 případech. I přes opravdu velmi nízký počet vzorků v konkrétních cytologických skupinách je patrné, že s rostoucí vážností cytologického nálezu, roste i procentuální zastoupení vzorků s detekovanou metylací miR-124-2. Tato vlastnost miR-124-2 je v souladu s doposud publikovanými poznatky o využití miR-124-2 jako triážového markeru pro detekci pokročilých CIN a cervikálního karcinomu.[234,173] Na základě pozitivní metylační analýzy QIAsure, zařazené jako triážový test hrHPV-pozitivních pacientek v cervikálním screeningu, by tak bylo pro následná lékařská vyšetření (kolposkopie nebo konizace) doporučeno celkem 37 pacientek. Zbylé pacientky by byly doporučeny k pokračování v běžném screeningovém procesu. Pro přesnější vyhodnocení a stanovení rizika rozvoje prekancerózních lézí a cervikálního karcinomu, na základě pozitivní metylační analýzy FAM19A4/mir-124-2 u hrHPV-pozitivních pacientek, bude od září 2020 hodnocen dvouletý follow-up.

Deregulace exprese miRNA a možnost využití panelového triážového testu, založeného na analýze změny exprese některých miRNA v souvislosti s rozvojem intraepiteliálních lézí a cervikálního karcinomu u HPV-pozitivních žen, byla testována v posledních letech v několika nezávislých studiích.[193,196,235] Pro normalizaci miRNA exprese v cervikálních stěrech byla na základě odborné studie vybrána miRNA-423-3p, která byla v kombinaci s RNU43 popsána jako vhodná referenční miRNA při analýze exprese miRNA v gynekologických cervikálních stěrech.[217] RNU43 však nebyla do testování, kvůli nedostupnosti v TaqMan systému, zařazena. Po dokončení testovacích PCR reakcí bylo nakonec v této diplomové práci testováno pouze pět miRNA, u nichž byla v předešlých studiích popsána změna exprese v souvislosti cytologickými cervikálními změnami. U miRNA-16-5p, miRNA-20a-5p, miRNA-20b-5p, miRNA-93-5p byla v souvislosti s rozvojem cervikálního karcinomu popsána zvýšená exprese v porovnání se vzorky bez intraepiteliálních lézí. U miRNA-34a-5p je popisována snížená exprese.[196,197] Signifikantní snížení exprese miRNA-34a-5p bylo potvrzeno i při zařazení této miRNA, společně s třemi dalšími, do panelového triážového testu pro detekci ASC-US+.[193]

Po dokončení analýzy exprese miRNA u 127 cervikálních vzorků bylo zjištěno, že dochází ke změně exprese u 5 ze 6 miRNA v závislosti na hrHPV pozitivitě. Tato

závislost byla pozorována rovněž u normalizační miRNA, a proto bylo opuštěno od metody relativní kvantifikace a bylo využito metody absolutní kvantifikace. Porovnáním absolutních hodnot PCR analýzy s výsledky cytologického nálezu (normální/abnormální) nebyla zjištěna žádná významná změna exprese. Pouze u miRNA-20a-5p byla nalezena nižší exprese u vzorků s abnormální cytologií v porovnání se vzorky s normálním nálezem cytologie. Zvýšení exprese miRNA-16-5p, miRNA-20a-5p, miRNA-20b-5p a miRNA-93-5p a snížení exprese miRNA-34a-5p v souvislosti abnormálními cytologickými nálezy, jak bylo popsáno ve studiích Pardini et al. (2018) a Snoek et al. (2018), se nepovedlo prokázat. Příčinou může být fakt, že se v této studii jedná o neselektovanou screeningovou populaci bez předchozích cytologických abnormalit a testovaný soubor tedy neobsahuje žádné případy s těžšími cervikálními intraepiteliálními lézemi ani cervikálními karcinomy, na jejichž úrovni jsou změny v expresi miRNA v literatuře popsány a validovány.[196,197]

IX. ZÁVĚR

Výsledky, prezentované v této diplomové práci, dokazují vysokou prevalenci hrHPV-pozitivity ve screeningové populaci českých žen. Pro screeningové testování bylo využito párových gynekologických a samoodběrových stěrů, u nichž byla prokázána vysoká konkordance hrHPV-pozitivity, potvrzující možnost využití samoodběrových sad jako rovnocenné testovací metody pro primární HPV screening. U souboru hrHPV-pozitivních cervikálních stěrů byl také proveden triážový QIAsure Methylation test, validovaný pro triážové testování a detekci prekancerózních lézí a cervikálního karcinomu v procesu primárního HPV screeningu. V navazující práci budou hodnoceny kontrolní stěry po dvouletém sledování a bude tak monitorována změna stavu testovaných pacientek a predikce rizika rozvoje cervikálního karcinomu v souvislosti s výsledky QIAsure testu. V poslední fázi experimentální práce bylo testováno použití analýzy exprese miRNA pro využití v triážovém testování hrHPV-pozitivních žen. Na základě předložených výsledků však nebyla prokázána žádná změna exprese v souvislosti se změnou zdravotního stavu pacientek. Výsledky byly nicméně hodnoceny u malého souboru pacientek a na velmi úzkém výběru testovaných miRNA. V navazující práci bude soubor testovaných žen ze screeningové populace rozšířen o pacientky s prokázanou cytologickou nebo histologickou abnormalitou, aby mohla být změna exprese miRNA testována na úrovni všech patologických stavů, předcházejících vznik cervikálního karcinomu. V navazující práci bude rovněž rozšířen panel testovaných miRNA, u nichž byla popsána určitá míra deregulace v souvislosti s patologických změnami děložního hrdla.

X. ABECEDNÍ SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	adenokarcinom
ADLX1	distal-less homeobox 1
AGC	atypické cylindrické buňky
AIS	adenokarcinom in situ
ANKRD18CP	ankyrin repeat domain 18C, pseudogene
ASC	adenoskvamozní karcinom
ASC-H	atypický skvamózní epitel bez vyloučení high-grade lézí
ASC-US	atypický skvamózní epitel nejasného významu
ASTN1	astrotactin 1
BPV-1	hovězí papilomavirus typu 1
CADM1	cell adhesion molecule 1
Cdk	cyklin-dependentní kináza
CDPI3	dihydropyrroloindolový tripeptid
CFS	common fragile sites
CIN 1/2/3	cervikální intraepiteliální neoplazie 1/2/3
COX-2	cyklooxygenáza 2
CS	cervikální stěr
CVS	cervikovaginální stěr
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
E6-AP	E6-asociovaný protein
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EPB41L3	Erythrocyte membrane protein band 4. 1-like 3
FAM	karboxyfluorescein
FHIT	fragile histidine triade protein
HC2	Hybrid Capture 2
HDAC	histondeacetylázy
hDlg	human homologue of the Drosophila discs large protein
HMGA-2	high-mobility group AT-hook 2

HPV	lidský papilomavirus
hrHPV	vysoko rizikový lidský papilomavirus
hScrib	protein Scribble homolog
HSIL	high-grade skvamózní intraepiteliální léze
hTERT	lidská telomerázová reverzní transkriptáza
CHL1	close homolog of L1
ICTV	Mezinárodní výbor pro klasifikaci virů
ITGA4	integrin subunit alpha 4
JAM3	junction adhesion molecule 3
JNK	c-Jun N-terminální kinázy
LBC	liquid-based cytology
LCR	dlouhý kontrolní region
lrHPV	nízko rizikový lidský papilomavirus
LRP1B	low-density lipoprotein receptor-related protein 1B
LSIL	low-grade skvamózní intraepiteliální léze
MAGI-1/2/3	membrane-associated guanylate kinase 1/2/3
MAL	T-lymphocyte maturation associated protein
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MGB	minor groove binder
MMBIR	microhomology-mediated break-induced replication
MUPP-1	multi-PDZ domain protien 1
NCR	nekódující region
NILM	normální nález bez intraepiteliálních lézí nebo malignit
NPV	negativní prediktivní hodnota
ORF	otevřený čtecí rámec
PBM	PDZ vazebný motiv
PML	promyelotický leukemický protein
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
pRB	protein retinoblastom
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PV	papilomavirus
QM-MSP	kvantitativní multiplexní metylačně-specifická real-time PCR

RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	relativní světelné jendotky
RPA	replikační protein A
RXFP3	relaxin/insulin like family peptide receptor 3
SAPK	stresem aktivované proteinkinázy
SCC	skvamocelulární karcinom
SOX1	SRY-box 1
SOX17	SRY-box 17
STM	specimen transporting medium
TAMRA	karboxytetramethylrhodamin
TP53	tumor protein p53
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VIA	vizuální kontrola pomocí kyseliny octové
VLP	virus-like particles
WHO	Světová zdravotnická organizace
WNT1	Wnt family member 1
ZNF671	Zinc finger protein 671
ZSCAN1	Zinc Finger And SCAN Domain Containing 1

XI. REFERENCE

1. Syrjanen, K. *et al.* Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex. Transm. Dis.* **17**, 15–19 (1990).
2. Chesson, H. W., Dunne, E. F., Hariri, S. & Markowitz, L. E. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex. Transm. Dis.* **41**, 660–664 (2014).
3. Rodriguez, A. C. *et al.* Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 513–517 (2008).
4. Hausen, H. zur. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1288**, F55–F78 (1996).
5. World Health Organization. *Comprehensive cervical cancer control : a guide to essential practice.* (2014).
6. Vink, M. A. *et al.* Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. *Am. J. Epidemiol.* **178**, 1161–1169 (2013).
7. Simms, K. T. *et al.* Impact of scaled up human papillomavirus vaccination and cervical screening and the potential for global elimination of cervical cancer in 181 countries, 2020–99: a modelling study. *Lancet Oncol.* **20**, 394–407 (2019).
8. Schiffman, M. *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16086 (2016).
9. von Karsa, L. *et al.* European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Res.* **1**, 27–84 (2015).
10. de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U. & zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**, 17–27 (2004).
11. Van Doorslaer, K. Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* **445**, 11–20 (2013).
12. Araldi, R. P. *et al.* The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 1537–1556 (2018).
13. Bzhalava, D. *et al.* Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci. Rep.* **4**, 5807 (2014).
14. Van Doorslaer, K. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J. Gen. Virol.* **99**, 989–990 (2018).
15. Bernard, H.-U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**, 70–79 (2010).
16. Bernard, H.-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* **32 Suppl 1**, S1-6 (2005).
17. Muñoz, N. *et al.* Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types

Associated with Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 518–527 (2003).

18. Tommasino, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **26**, 13–21 (2014).

19. zur Hausen, H. Viruses in human cancers. *Science (80-.).* **254**, 1167 LP – 1173 (1991).

20. Clifford, G. M. *et al.* Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* **366**, 991–998 (2005).

21. Wang, J. *et al.* HPV genotype prevalence and distribution during 2009-2018 in Xinjiang, China: baseline surveys prior to mass HPV vaccination. *BMC Womens. Health* **19**, 90 (2019).

22. Mollers, M. *et al.* Prevalence, incidence and persistence of genital HPV infections in a large cohort of sexually active young women in the Netherlands. *Vaccine* **31**, 394–401 (2013).

23. Ustav, M. & Stenlund, A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* **10**, 449–457 (1991).

24. Wilson, V. G., West, M., Woytek, K. & Rangasamy, D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* **24**, 275–290 (2002).

25. Yang, L. *et al.* The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5086–5090 (1993).

26. MacPherson, P., Thorner, L., Parker, L. M. & Botchan, M. The Bovine Papilloma Virus E1 Protein Has ATPase Activity Essential to Viral DNA Replication and Efficient Transformation in Cells. *Virology* **204**, 403–408 (1994).

27. Steger, G., Ham, J. & Yaniv, M. E2 proteins: modulators of papillomavirus transcription and replication. *Methods Enzymol.* **274**, 173–185 (1996).

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

29. Enemark, E. J., Stenlund, A. & Joshua-Tor, L. Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. *EMBO J.* **21**, 1487–1496 (2002).

30. Seligmann, R. K. E.-H. The Role of E2 Proteins in Papillomavirus DNA Replication. in Ch. 28 (IntechOpen, 2011). doi:10.5772/19609

31. Park, P. *et al.* The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8700–8704 (1994).

32. Clower, R. V, Fisk, J. C. & Melendy, T. Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J. Virol.* **80**, 1584–1587 (2006).

33. Han, Y., Loo, Y. M., Militello, K. T. & Melendy, T. Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian

virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J. Virol.* **73**, 4899–4907 (1999).

34. Thierry, F. & Yaniv, M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* **6**, 3391–3397 (1987).

35. Steger, G. & Corbach, S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* **71**, 50–58 (1997).

36. Nasseri, M., Hirochika, R., Broker, T. R. & Chow, L. T. A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1--E4 protein. *Virology* **159**, 433–439 (1987).

37. Doorbar, J. *et al.* Characterization of Events during the Late Stages of HPV16 Infectionin VivoUsing High-Affinity Synthetic Fabs to E4. *Virology* **238**, 40–52 (1997).

38. Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. & Crawford, L. Specific interaction between HPV-16 E1–E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824–827 (1991).

39. McIntosh, P. B. *et al.* E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J. Cell Sci.* **123**, 2810–2822 (2010).

40. Nakahara, T. *et al.* Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J. Virol.* **76**, 10914–10920 (2002).

41. Horwitz, B., Burkhardt, A., Schlegel, R. & Dimaio, D. 44-amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific carboxyl-terminal amino acids. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4071–4078 (1988).

42. Bubb, V., McCance, D. J. & Schlegel, R. DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology* **163**, 243–246 (1988).

43. Conrad, M., Bubb, V. J. & Schlegel, R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* **67**, 6170–6178 (1993).

44. Gieswein, C. E., Sharom, F. J. & Wildeman, A. G. Oligomerization of the E5 protein of human papillomavirus type 16 occurs through multiple hydrophobic regions. *Virology* **313**, 415–426 (2003).

45. Venuti, A. *et al.* Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer* **10**, 140 (2011).

46. Pim, D., Collins, M. & Banks, L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* **7**, 27–32 (1992).

47. Straight, S. W., Herman, B. & McCance, D. J. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* **69**, 3185–3192 (1995).

48. Boulet, G., Horvath, C., Vanden Broeck, D., Sahebali, S. & Bogers, J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 2006–2011

(2007).

49. Songyang, Z. *et al.* Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**, 73–77 (1997).

50. Pim, D. *et al.* Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS J.* **279**, 3530–3537 (2012).

51. Kiyono, T. *et al.* Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11612–11616 (1997).

52. Nakagawa, S. & Huibregtse, J. M. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8244—8253 (2000).

53. Lee, S. S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. & Javier, R. T. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* **74**, 9680–9693 (2000).

54. Glaunsinger, B. A., Lee, S. S., Thomas, M., Banks, L. & Javier, R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* **19**, 5270–5280 (2000).

55. Thomas, M. *et al.* Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* **21**, 5088–5096 (2002).

56. Lee, C. & Laimins, L. A. Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **78**, 12366–12377 (2004).

57. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129–1136 (1990).

58. Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4918–4927 (1993).

59. Scheffner, M., Nuber, U. & Huibregtse, J. M. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**, 81–83 (1995).

60. Pappa, K., Kontostathi, G., Lygirou, V., Zoidakis, J. & Anagnou, N. Novel structural approaches concerning HPV proteins: Insight into targeted therapies for cervical cancer (Review). *Oncol. Rep.* **39**, (2018).

61. Klingelhutz, A. J., Foster, S. A. & McDougall, J. K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**, 79–82 (1996).

62. Oh, S. T., Kyo, S. & Laimins, L. A. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J. Virol.* **75**, 5559–5566 (2001).

63. Munger, K. *et al.* Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* **78**, 11451–11460 (2004).

64. Munger, K. *et al.* Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* **8**, 4099–4105 (1989).

65. Barbosa, M. S., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* **63**, 1404–1407 (1989).

66. Clemens, K. E., Brent, R., Gyuris, J. & Munger, K. Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* **214**, 289–293 (1995).

67. Dyson, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245–2262 (1998).

68. Brehm, A. *et al.* Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**, 597–601 (1998).

69. Helin, K., Harlow, E. & Fattaey, A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6501–6508 (1993).

70. Lundberg, A. S. & Weinberg, R. A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 753–761 (1998).

71. Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. & Harlow, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science (80-.).* **243**, 934 LP – 937 (1989).

72. Chellappan, S. *et al.* Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4549–4553 (1992).

73. Zerfass, K. *et al.* Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.* **69**, 6389–6399 (1995).

74. Jones, D. L., Alani, R. M. & Munger, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* **11**, 2101–2111 (1997).

75. Zerfass-Thome, K. *et al.* Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**, 2323–2330 (1996).

76. Polyak, K. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**, 9–22 (1994).

77. Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A. & Massague, J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* **9**, 1831–1845 (1995).

78. Katich, S. C., Zerfass-Thome, K. & Hoffmann, I. Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene. *Oncogene* **20**, 543–550 (2001).

79. Blomberg, I. & Hoffmann, I. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6183–6194 (1999).

80. Baker, T. S. *et al.* Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* **60**, 1445–1456 (1991).

81. Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 12180–12184 (1992).

82. Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S. & Garcea, R. L. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* **77**, 4818–4826 (2003).

83. Buck, C. B. *et al.* Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J. Virol.* **82**, 5190–5197 (2008).

84. Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K. & Beard, P. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J. Mol. Biol.* **283**, 529–536 (1998).

85. Modis, Y., Trus, B. L. & Harrison, S. C. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* **21**, 4754–4762 (2002).

86. Pentamer Structure of Major Capsid protein L1 of Human Papilloma Virus type 11 [online]. Datum přístupu 4. 6. 2020. Dostupné z https://cdn.rcsb.org/images/rutgers/r5/2r5k/2r5k.pdb1-500.jpg.

87. Egawa, K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* **207**, 251–254 (2003).

88. Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **75**, 1565–1570 (2001).

89. Culp, T. D., Budgeon, L. R., Marinkovich, M. P., Meneguzzi, G. & Christensen, N. D. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J. Virol.* **80**, 8940–8950 (2006).

90. Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Day, P. M. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1522–1527 (2006).

91. Schelhaas, M. *et al.* Entry of Human Papillomavirus Type 16 by Actin-Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. *PLOS Pathog.* **8**, e1002657 (2012).

92. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J.* **30**, 3481–3500 (2011).

93. Bienkowska-Haba, M., Williams, C., Kim, S. M., Garcea, R. L. & Sapp, M. Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. *J. Virol.* **86**, 9875–9887 (2012).

94. DiGiuseppe, S., Bienkowska-Haba, M., Guion, L. G. M., Keiffer, T. R. & Sapp, M. Human Papillomavirus Major Capsid Protein L1 Remains Associated with the Incoming Viral Genome throughout the Entry Process. *J. Virol.* **91**, (2017).

95. Day, P. M., Baker, C. C., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML)

expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14252–14257 (2004).

96. Maglennon, G. A., McIntosh, P. & Doorbar, J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* **414**, 153–163 (2011).

97. Thomas, J. T., Hubert, W. G., Ruesch, M. N. & Laimins, L. A. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 8449 LP – 8454 (1999).

98. Middleton, K. *et al.* Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* **77**, 10186–10201 (2003).

99. Doorbar, J. *et al.* The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* **30**, F55–F70 (2012).

100. Hummel, M., Hudson, J. B. & Laimins, L. A. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* **66**, 6070–6080 (1992).

101. Fehrmann, F., Klumpp, D. J. & Laimins, L. A. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* **77**, 2819–2831 (2003).

102. Gheit, T. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology . *Frontiers in Oncology* **9**, 355 (2019).

103. Holmgren, S. C., Patterson, N. A., Ozbun, M. A. & Lambert, P. F. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J. Virol.* **79**, 3938–3948 (2005).

104. Florin, L. *et al.* Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J. Virol.* **78**, 5546–5553 (2004).

105. Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E. & Sapp, M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. Virol.* **76**, 10009–10014 (2002).

106. Cardone, G. *et al.* Maturation of the human papillomavirus 16 capsid. *MBio* **5**, e01104-e1114 (2014).

107. Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. & Wacholder, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)* **370**, 890–907 (2007).

108. McBride, A. A. & Warburton, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLOS Pathog.* **13**, e1006211 (2017).

109. Stanley, M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* **24 Suppl 1**, S16-22 (2006).

110. Franco, E. L. *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.* **180**, 1415–1423 (1999).

111. Kristiansen, E., Jenkins, A. & Holm, R. Coexistence of episomal and integrated

HPV16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix. *J. Clin. Pathol.* **47**, 253–256 (1994).

112. Network, C. G. A. R. *et al.* Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* **543**, 378–384 (2017).

113. Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L. & Lambert, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* **69**, 2989–2997 (1995).

114. Schmitz, M., Driesch, C., Jansen, L., Runnebaum, I. B. & Dürst, M. Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One* **7**, e39632–e39632 (2012).

115. Thorland, E. C. *et al.* Human Papillomavirus Type 16 Integrations in Cervical Tumors Frequently Occur in Common Fragile Sites. *Cancer Res.* **60**, 5916 LP – 5921 (2000).

116. Hu, Z. *et al.* Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat. Genet.* **47**, 158–163 (2015).

117. Akagi, K. *et al.* Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res.* **24**, 185–199 (2014).

118. Baker, C. C. *et al.* Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* **61**, 962–971 (1987).

119. Choo, K. B., Pan, C. C. & Han, S. H. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* **161**, 259–261 (1987).

120. Romanczuk, H. & Howley, P. M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3159–3163 (1992).

121. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).

122. DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUDÍK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2020-2-03]. Dostupný z WWW: http://www.svod.cz. Verze 7.0 [2007], .

123. Tiltman, A. J. The pathology of cervical tumours. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **19**, 485–500 (2005).

124. Vizcaino, A. P. *et al.* International trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous-cell carcinoma. *Int. J. cancer* **86**, 429–435 (2000).

125. Vizcaino, A. P. *et al.* International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *Int. J. cancer* **75**, 536–545 (1998).

126. DeVita Jr, V., Lawrence, T. & Rosenberg, S. *DeVIta, Hellman, and Rosenberg's*

Cancer: Principles and Practice of Oncology. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology* (2008).

127. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017. *Relev. Epidemiol. Hebd.* **92**, 241–268 (2017).

128. WHO/ Immunization,Vaccines and Biologicals database, dostupné z. Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/VaccineIntroStatus.pptx?ua=1.

129. Kumar, L., Harish, P., Malik, P. S. & Khurana, S. Chemotherapy and targeted therapy in the management of cervical cancer. *Curr. Probl. Cancer* **42**, 120–128 (2018).

130. Suzuki, K. *et al.* Phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab for advanced or recurrent cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* **154**, 554–557 (2019).

131. Friedman, C. F. *et al.* A phase II study of atezolizumab in combination with bevacizumab in patients with recurrent, persistent or metastatic cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* **154**, 17–18 (2019).

132. Májek, O., Dvořák, V., Dušek, L., Mužík, J., Šnajdrová, L., Gregor, J. Cervix.cz – Program cervikálního screeningu v České republice [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2020. [cit. 2020-02-03]. Dostupný z WWW: http://www.cervix.cz. ISSN 1804-087X.

133. PAPANICOLAOU, G. N. A NEW PROCEDURE FOR STAINING VAGINAL SMEARS. *Science (80-.).* **95**, 438–439 (1942).

134. Denny, L. Cytological screening for cervical cancer prevention. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **26**, 189–196 (2012).

135. Soloman, D. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: Developed and approved at the national cancer institute workshop in Bethesda, MD, December 12–13, 1988. *Diagn. Cytopathol.* **5**, 331–334 (1989).

136. Nayar, R. & Wilbur, D. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes*. (2015). doi:10.1007/978-3-319-11074-5

137. J. Dušková, A. Beková, V. Dvořák, O. Májek, L. D. Results of the Czech National Cervical Cancer Screening Programme. *Klin Onkol* **27 (Suppl**, 79–86 (2014).

138. Crum, C. P., Meserve, E. E. & Peters, W. A. Chapter 13 - Cervical Squamous Neoplasia. in (eds. Crum, C. P. et al.) 298–374 (Content Repository Only!, 2018). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44732-4.00013-3

139. Maver, P. J. & Poljak, M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clin. Microbiol. Infect.* (2019). doi:10.1016/j.cmi.2019.09.006

140. Ronco, G. *et al.* Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* **383**, 524–532 (2014).

141. Poljak, M., Kocjan, B. J., Ostrbenk, A. & Seme, K. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. *J. Clin. Virol.* **76**

Suppl 1, S3–S13 (2016).

142. Arbyn, M. *et al.* Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 817–826 (2015).

143. Polman, N. J., Snijders, P. J. F., Kenter, G. G., Berkhof, J. & Meijer, C. J. L. M. HPV-based cervical screening: Rationale, expectations and future perspectives of the new Dutch screening programme. *Prev. Med. (Baltim).* **119**, 108–117 (2019).

144. Wentzensen, N. *et al.* Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice. *Int. J. Cancer* **140**, 2192–2200 (2017).

145. Dijkstra, M. G. *et al.* Primary hrHPV DNA Testing in Cervical Cancer Screening: How to Manage Screen-Positive Women? A POBASCAM Trial Substudy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* **23**, 55 LP – 63 (2014).

146. Rijkaart, D. C. *et al.* Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int. J. Cancer* **130**, 602–610 (2012).

147. Huh, W. K. *et al.* Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Obstet. Gynecol.* **125**, 330–337 (2015).

148. Schiffman, M. *et al.* A Long-term Prospective Study of Type-Specific Human Papillomavirus Infection and Risk of Cervical Neoplasia Among 20,000 Women in the Portland Kaiser Cohort Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* **20**, 1398 LP – 1409 (2011).

149. Schiffman, M. *et al.* A study of genotyping for management of human papillomavirus-positive, cytology-negative cervical screening results. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 52–59 (2015).

150. Khan, M. J. *et al.* The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1072–1079 (2005).

151. Lew, J.-B. *et al.* Effectiveness Modelling and Economic Evaluation of Primary HPV Screening for Cervical Cancer Prevention in New Zealand. *PLoS One* **11**, e0151619–e0151619 (2016).

152. Gultekin, M. *et al.* Initial results of population based cervical cancer screening program using HPV testing in one million Turkish women. *Int. J. cancer* **142**, 1952–1958 (2018).

153. Castle, P. E. *et al.* Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol.* **12**, 880–890 (2011).

154. Meijer, C. J. L. M. & Berkhof, J. Cervical cancer—should we abandon cytology for screening? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**, 558–559 (2012).

155. Wentzensen, N. & von Knebel Doeberitz, M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis. Markers* **23**, 315–330 (2007).

156. Carozzi, F. *et al.* Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **14**, 168–176 (2013).

157. Wentzensen, N. *et al.* Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer Cytopathol.* **105**, 461–467 (2005).

158. Allia, E. *et al.* Interpretation of p16INK4a/Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol.* **123**, 212–218 (2015).

159. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* **182**, 311–322 (2000).

160. Wright Jr., T. C. *et al.* Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol. Oncol.* **144**, 51–56 (2017).

161. Petry, K. U. *et al.* Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol. Oncol.* **121**, 505–509 (2011).

162. Ikenberg, H. *et al.* Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1550–1557 (2013).

163. Wentzensen, N. *et al.* p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, djv257 (2015).

164. McMenamin, M., McKenna, M. & McDowell, A. Clinical Utility of CINtec PLUS Triage in Equivocal Cervical Cytology and Human Papillomavirus Primary Screening. *Am. J. Clin. Pathol.* **150**, 512–521 (2018).

165. Loghavi, S., Walts, A. E. & Bose, S. CINtec(R) PLUS dual immunostain: a triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn. Cytopathol.* **41**, 582–587 (2013).

166. Dual-stain testing on Pap test samples identifies the presence of two proteins: p16 (brown) and Ki-67 (red) [online]. Datum přístupu 4. 6. 2020. Dostupné z https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2018/dual-stain-test-cervical-hpv-positive.

167. Steenbergen, R. D. M., Snijders, P. J. F., Heideman, D. A. M. & Meijer, C. J. L. M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 395–405 (2014).

168. Reesink-Peters, N. *et al.* Detecting cervical cancer by quantitative promoter hypermethylation assay on cervical scrapings: a feasibility study. *Mol. Cancer Res.* **2**, 289–295 (2004).

169. De Strooper, L. M. A. *et al.* Cervical cancer risk in HPV-positive women after a negative FAM19A4/mir124-2 methylation test: A post hoc analysis in the POBASCAM trial with 14 year follow-up. *Int. J. Cancer* **143**, 1541–1548 (2018).

170. Leeman, A. *et al.* Reliable identification of women with CIN3+ using hrHPV genotyping and methylation markers in a cytology-screened referral population. *Int. J. cancer* **144**, 160–168 (2019).

171. De Strooper, L. M. A. *et al.* Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol. Oncol.* **141**, 341–347 (2016).

172. Dankai, W. *et al.* Role of genomic DNA methylation in detection of cytologic and histologic abnormalities in high risk HPV-infected women. *PLoS One* **14**, e0210289–e0210289 (2019).

173. De Strooper, L. M. A. *et al.* CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J. Clin. Pathol.* **67**, 1067–1071 (2014).

174. Hansel, A. *et al.* A promising DNA methylation signature for the triage of high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *PLoS One* **9**, e91905–e91905 (2014).

175. Schmitz, M. *et al.* Performance of a methylation specific real-time PCR assay as a triage test for HPV-positive women. *Clin. Epigenetics* **9**, 118 (2017).

176. Schmitz, M. *et al.* Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages. *BMC Cancer* **18**, 1197 (2018).

177. Verlaat, W. *et al.* Identification and Validation of a 3-Gene Methylation Classifier for HPV-Based Cervical Screening on Self-Samples. *Clin. Cancer Res.* **24**, 3456–3464 (2018).

178. van Leeuwen, R. W. *et al.* DNA methylation markers as a triage test for identification of cervical lesions in a high risk human papillomavirus positive screening cohort. *Int. J. cancer* **144**, 746–754 (2019).

179. Swan, D. C. *et al.* Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1030–1034 (1999).

180. Luo, H. *et al.* Evaluation of Viral Load as a Triage Strategy With Primary High-Risk Human Papillomavirus Cervical Cancer Screening. *J. Low. Genit. Tract Dis.* **21**, (2017).

181. Luo, H., Du, H., Belinson, J. L. & Wu, R. Evaluation of alternately combining HPV viral load and 16/18 genotyping in secondary screening algorithms. *PLoS One* **14**, e0220200–e0220200 (2019).

182. Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).

183. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–4060 (2004).

184. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101 (2006).

185. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.

Genes Dev. **18**, 3016–3027 (2004).

186. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185–191 (2004).

187. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366 (2001).

188. Matsuyama, H. & Suzuki, H. I. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2019).

189. Li, Y. & Kowdley, K. V. MicroRNAs in common human diseases. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **10**, 246–253 (2012).

190. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).

191. Lagos-Quintana, M. *et al.* Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* **12**, 735–739 (2002).

192. Iorio, M. V & Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J.* **18**, 215–222 (2012).

193. Tian, Q. *et al.* MicroRNA Detection in Cervical Exfoliated Cells as a Triage for Human Papillomavirus–Positive Women. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **106**, (2014).

194. Iorio, M. V & Croce, C. M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5848–5856 (2009).

195. Calin, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2999–3004 (2004).

196. Pardini, B. *et al.* MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review. *BMC Cancer* **18**, 696 (2018).

197. Snoek, B. C. *et al.* Genome-wide microRNA analysis of HPV-positive self-samples yields novel triage markers for early detection of cervical cancer. *Int. J. cancer* **144**, 372–379 (2019).

198. Li, Y. *et al.* Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J. Pathol.* **224**, 484–495 (2011).

199. Zeng, K. *et al.* Dysregulated microRNAs involved in the progression of cervical neoplasm. *Arch. Gynecol. Obstet.* **292**, 905–913 (2015).

200. Wilting, S. M. *et al.* Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene* **32**, 106–116 (2013).

201. Pereira, P. M., Marques, J. P., Soares, A. R., Carreto, L. & Santos, M. A. S. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* **5**, e11780–e11780 (2010).

202. Farazi, T. A., Hoell, J. I., Morozov, P. & Tuschl, T. MicroRNAs in human cancer.

Adv. Exp. Med. Biol. **774**, 1–20 (2013).

203. Ma, L. *et al.* miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 247–256 (2010).

204. Long, M.-J. *et al.* MicroRNA-10a targets CHL1 and promotes cell growth, migration and invasion in human cervical cancer cells. *Cancer Lett.* **324**, 186–196 (2012).

205. Peralta-Zaragoza, O. *et al.* Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC Cancer* **16**, 215 (2016).

206. Xu, Y. *et al.* MicroRNA-218-5p inhibits cell growth and metastasis in cervical cancer via LYN/NF-κB signaling pathway. *Cancer Cell Int.* **18**, 198 (2018).

207. Hermeking, H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 613–626 (2012).

208. Babion, I. *et al.* Complementarity between miRNA expression analysis and DNA methylation analysis in hrHPV-positive cervical scrapes for the detection of cervical disease. *Epigenetics* **14**, 558–567 (2019).

209. Lörincz, A. T. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **22**, 629–636 (1996).

210. Huang, S. *et al.* Principles and analytical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test. *J. Clin. Virol.* **45**, S13–S17 (2009).

211. Hesselink, A. T. *et al.* Clinical validation of the HPV-risk assay, a novel real-time PCR assay for detection of high-risk human papillomavirus DNA by targeting the E7 region. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 890–896 (2014).

212. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. & Gelfand, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7276–7280 (1991).

213. Gibson, U. E., Heid, C. A. & Williams, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**, 995–1001 (1996).

214. Afonina, I., Kutyavin, I., Lukhtanov, E., Meyer, R. B. & Gamper, H. Sequence-specific arrest of primer extension on single-stranded DNA by an oligonucleotide-minor groove binder conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3199–3204 (1996).

215. Kutyavin, I. V *et al.* 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* **28**, 655–661 (2000).

216. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).

217. Babion, I., Snoek, B. C., van de Wiel, M. A., Wilting, S. M. & Steenbergen, R. D. M. A Strategy to Find Suitable Reference Genes for miRNA Quantitative PCR Analysis and Its Application to Cervical Specimens. *J. Mol. Diagn.* **19**, 625–637

(2017).

218. De Strooper, L. M. A. *et al.* Methylation Analysis of the FAM19A4 Gene in Cervical Scrapes Is Highly Efficient in Detecting Cervical Carcinomas and Advanced CIN2/3 Lesions. *Cancer Prev. Res.* **7**, 1251 LP – 1257 (2014).

219. Wilting, S. M. *et al.* Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. *Mol. Cancer* **9**, 167 (2010).

220. Eads, C. A. *et al.* MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **28**, E32 (2000).

221. Tachezy, R., Smahelova, J., Kaspirkova, J. & Salakova, M. Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One* **8**, e79156 (2013).

222. Bruni, L. *et al.* Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *J. Infect. Dis.* **202**, 1789–1799 (2010).

223. Cuzick, J. *et al.* Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int. J. Cancer* **119**, 1095–1101 (2006).

224. Arbyn, M. *et al.* Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S3/78-89 (2006).

225. Meijer, C. J. L. M. *et al.* Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int. J. cancer* **124**, 516–520 (2009).

226. Arbyn, M. *et al.* Detecting cervical precancer and reaching underscreened women by using HPV testing on self samples: updated meta-analyses. *BMJ* **363**, k4823–k4823 (2018).

227. Cuzick, J. *et al.* Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br. J. Cancer* **108**, 908–913 (2013).

228. Poljak, M. *et al.* Comparison of Clinical and Analytical Performance of the Abbott RealTime High Risk HPV Test to the Performance of Hybrid Capture 2 in Population-Based Cervical Cancer Screening. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1721 LP – 1729 (2011).

229. Ondryášová, H. *et al.* [Utilization of self-sampling kits for HPV testing in cervical cancer screening - pilot study]. *Ces. Gynekol.* **80**, 436–443 (2015).

230. Dijkstra, M. G. *et al.* Brush-based self-sampling in combination with GP5+/6+-PCR-based hrHPV testing: high concordance with physician-taken cervical scrapes for HPV genotyping and detection of high-grade CIN. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **54**, 147–151 (2012).

231. Tranberg, M. *et al.* Good concordance of HPV detection between cervico-vaginal self-samples and general practitioner-collected samples using the Cobas 4800 HPV DNA test. *BMC Infect. Dis.* **18**, 348 (2018).

232. Verhoef, V. M. J. *et al.* Triage by methylation-marker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervicovaginal specimens

(PROHTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet. Oncol.* **15**, 315–322 (2014).

233. Luttmer, R. *et al.* Comparing the performance of FAM19A4 methylation analysis, cytology and HPV16/18 genotyping for the detection of cervical (pre)cancer in high-risk HPV-positive women of a gynecologic outpatient population (COMETH study). *Int. J. cancer* **138**, 992–1002 (2016).

234. Del Pino, M. *et al.* CADM1, MAL, and miR124 Promoter Methylation as Biomarkers of Transforming Cervical Intrapithelial Lesions. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).

235. Babion, I. *et al.* Triage of high-risk HPV-positive women in population-based screening by miRNA expression analysis in cervical scrapes; a feasibility study. *Clin. Epigenetics* **10**, 76 (2018).