

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor 06 Zdravotnictví

Integrace HPV viru do lidského genomu jako biomarker progresu cervikálních neoplazií

Human papilloma virus integration to the host DNA and its relation to precancerous status in cervical cancer

Autor: Vyhnalová Tereza

Škola: Klvaňovo gymnázium a Střední zdravotnická škola Kyjov; příspěvková organizace

Konzultant: Ing. Rastislav Slavkovský, PhD.

Kyjov 2017

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně, použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V dne podpis:

Poděkování

Mé velké díky patří především Ing. Rastislavu Slavkovskému, Ph.D, za odborné vedení práce a poskytnutí cenných rad. Také si velmi vážím jeho ochoty odpovídat na mé otázky a trpělivosti, kterou pro mne měl.

Dále bych ráda poděkovala kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny Olomouc, za možnost v této instituci svou práci vypracovávat. Především bych ráda vyjádřila dík laborantkám, působícím v laboratořích genetiky a cytogenetiky, za obětavou pomoc při vyhledávání jednotlivých vzorků.

Velmi si také cenním pomoci, kterou nám poskytla Dr. Carina Enklud z International HPV center, zasláním plazmidů, bez kterých by další výzkum nebyl umožněn.

V neposlední řadě jsem velmi vděčná za trpělivost profesorů Klvaňova gymnázia při dopisování písemných prací a toleranci mé časté školní absence s výzkumem spojené.

Anotace

Rakovina děložního čípku je závažné nádorové onemocnění, indukováno především vysokorizikovými (-high risk) HPV (human papillomavirus) viry. Těchto 13 genotypů je považováno za karcinogenní a jsou zřejmou příčinou invazivního karcinomu cervixu (*ICC*) po celém světě.¹⁸

Infekce epitelu děložního hrdla v oblasti tzv. transformační zóny lidskými papilomaviry je dnes považována za stěžejní příčinu vzniku prekancerózních stádií – tzv. cervikálních intraepiteliálních neoplázií.¹⁷ Tyto změny na dlaždicobuněčném epitelu jsou podle váhy nálezu děleny na méně závažné neoplazie *CIN 1* a závažnější *CIN2*, *CIN3*, které jsou označovány jako prekanzerózy.

Současná vyšetřovací metoda, screening děložního čípku, si klade za cíl tyto předrakovinové léze včas rozpoznat a předejít tak vzniku *ICC*, bohužel se však tento typ testování potýká s nižší citivitou a také s falešně pozitivními²¹ a falešně negativními nálezy.²⁶

Integrace DNA HPV viru do lidského genomu je považována za jeden z nejvíce rizikových faktorů pro vznik cervikálního karcinomu¹⁹ a je přítomná až v 90% všech karcinomů cervixu.⁴¹ Stupeň integrace lidských papilomavirů koreluje se stupněm cervikální intraepiteliální neoplazie a může být považován za marker progresu předrakovinových lézí.¹⁹ Pokud by byla vyvinuta metoda, která dokáže rychle a s přesností rozlišit integrovanou a volnou formu viru, mohla by pak skutečnost integrace sloužit jako důležitý prekursor pro vznik invazivního karcinomu a stát se novým nástrojem pro screeningový program. Stanovení integrace by bylo možno aplikovat i na další druhy rakoviny, které jsou spjaty s HPV infekcí u mužů i žen. Jedná se například o karcinomy krku, konečníku a zevních pohlavních orgánů. Plné pochopení mechanismů HPV integrace a její využití by tak mohlo vést ke zlepšení prevence či zpřesnění detekce mnoha papilomaviry indukovaných nádorových stavů.²¹

Cílem výzkumu bylo sestavit tuto metodu, která by fungovala na jednoduché bázi a byla by tak vhodná k zavedení do praxe. Lékařům by pak usnadnila určení závažnosti neoplazie a umožnila přesnější stanovení diagnózy a následné léčby. Tato skutečnost je velmi podstatná, jelikož *CIN1* a *CIN2* se léčí odlišnými způsoby.²⁰

Již zmiňovaná metoda by mohla zbytečnému podrobení pacientky invazivnímu zákroku, nebo naopak stanovit výrazně vyšší riziko rozvoje karcinomu.

Klíčová slova: cervix, integrace HPV do hostitelské DNA, rakovina děložního čípku, HPV

Annotation

Cancer of cervix is a serious tumour disease caused primarily by high risk HPV viruses. These 13 genotypes are considered carcinogenic and are the obvious reason for the invasive carcinoma of cervix (*ICC*) all over the world. Today, the human papillomavirus infection of uterine neck in the area of so-called transformation zone is regarded as the major reason for the origin of precancerous stadiums – cervical intraepithelial neoplasia. The changes of squamous epithelium are according to the significance divided into less serious neoplasia *CIN1* and more serious neoplasia *CIN2*, *CIN3*, which are called precancers.

The aim of the present-day method, cervical screening, is to recognise these precancerous lesions in time and prevent the origin of the *ICC*, however this testing method has a low sensitivity and often brings false positive or false negative findings.

The integration of the DNA HPV virus into the human's genome is believed to be one of the riskiest factors of the cervical carcinoma start and is present in over 90 percent of cases. The stage of the integration of human papillomaviruses correlates with the stage of cervical intraepithelial neoplasia and can be considered to be the marker of precancerous lesions progress. If a method capable of fast and precise recognition of a free form of a virus were developed, the integration could serve as an important precursor for the origin of invasive carcinoma and could become the new screening tool. Determination of the integration could be even used on other types of cancer related to HPV infections of men and women, for instance a carcinoma of neck, anus or external genitals. Fully understanding the HPV integration mechanism and its usage could lead to the improvement of prevention or more accurate detection of tumorous states caused by papillomaviruses.

The aim of this research is to develop this method, which would be simple and therefore appropriate to be used widely. Doctors could determine the significance of neoplasia more easily and could state the diagnosis and choose the upcoming treatment more accurately. This is a very important fact as *CIN1* and *CIN2* are treated differently. The method could as well prevent purposeless invasive interventions or point out much higher risk of carcinoma development.

Key words: cervix, papillomavirus integration to the host DNA, cancer of cervix, HPV

Obsah

ÚVOD	9
CÍLE PRÁCE	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. Anatomie děložního hrdla	12
2. Dlaždicobuněčný epitel a výskyt HPV infekce	13
3. Lidské papilomaviry	14
3.1 Organizace genomu lidských papilomavirů	15
3.1.1 Funkce virových proteinů E6 a E7	16
3.1.2 Funkce virových proteinů E1 a E2	17
3.1.3 Funkce virového proteinu E1/E4	18
3.1.4 Funkce virového proteinu E5	19
3.1.5 Funkce virových proteinů L1 a L2	19
3.2 Přenos papilomavirů	20
3.3 Vývojový cyklus HPV virů	20
3.3.1 Infekční cyklus papilomavirů	20
3.3.2 Replikační cyklus papilomaviru	21
3.4 Integrace HPV viru do hostitelské DNA	22
3.5 Imunitní odpověď organismu a osud HPV infekce	23
3.5.1 Imunitní odpověď organismu na HPV infekci	23
3.5.2 Průběh a osud HPV infekce	24
3.5.3 Očkování proti HPV infekci	25
4. Klinické projevy infekce papilomaviry	26
4.1 Genitální bradavice	26
4.2 Prekancerózy	26
4.2.1 Histopatologický grading	27
4.2.2 Cytologický grading	28
4.3 Maligní epitelové nádory cervixu	30
5. Diagnostika HPV infekce	31
5.1 Metody nepřímé	31
5.1.1 Histologické vyšetření	31
5.1.2 Cytologické vyšetření	32

5.1.3 Sérologická diagnostika.....	32
5.1.4 Kolposkopie	32
5.2 Metody přímé	33
5.2.1 Imunohistochemické metody	33
5.2.2 SCCA	33
5.2.3 DNA diagnostika	34
6. Léčebné metody cervikálních neoplazií a karcinomu.....	35
6.1 Léčebné metody cervikálních neoplazií	35
6.1.1 Destrukční metody	35
6.1.2 Abláčnické metody	35
6.2 Léčebné metody karcinomu cervixu.....	36
6.3 Metoda integrace vDNA do genomu hostitele	36
6.3.1 Možné užití metody	36
6.3.2 Princip metody na stanovení HPV integrace	37
6.3.3 Rozsah použití metody:	38
6.3.4 Koncipování kitu na detekci integrované formy	38
6.3.5 Nutné přístrojové vybavení:	39
6.3.6 Podmínky pro pracovní prostředí	39
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
Cíle experimentální části	40
1. Laboratorní pomůcky a přístrojové vybavení	41
2. Vzorky	42
2.1 Izolace DNA	42
2.2 HPV testace	42
3. Metody a pracovní postupy	43
3.1 Návrh primerů	43
3.1.1 Design primerů a práb pro E2, E6	44
3.1.1.1 Ověřování kvality primerů a práb pomocí PCR	45
3.1.1.2 Čipová elektroforéza	46
3.1.2 Design primerů pro E1, E2, L1, L2, LCR	48
3.1.2.1 Ověřování kvality primerů pomocí PCR	49

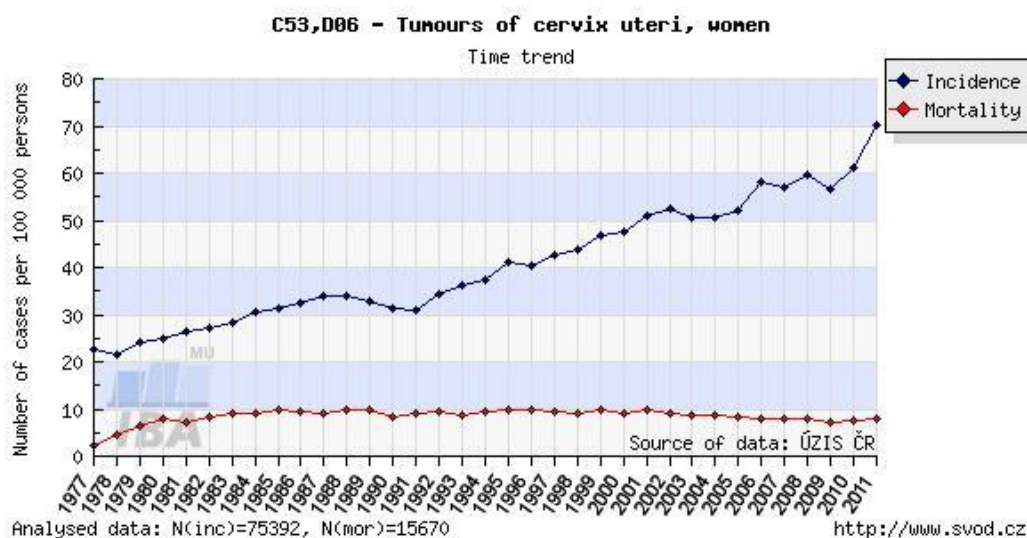
3.1.2.2 Čipová elektroforéza.....	50
3.2 Tvorba kalibračních řad	51
3.2.1 Stanovení koncentrace plazmidu.....	52
3.2.2 Linearizace plazmidu	53
3.2.3 Purifikace plazmidu	54
3.2.4 Měření koncentrace linearizovaného plazmidu.....	55
3.2.5 Ředění a tvorba kalibračních řad	56
3.2.6 Sekvenování plazmidu	57
3.2.7 Ověření kvality kalibračních řad pomocí PCR	58
3.3 PCR reakce.....	58
3.3.1 Optimalizace PCR.....	59
3.3.2 Master mix s použitím fluorescenčního barviva EvaGreen	60
3.3.3 Master mix s použitím fluorescenčních prób.....	61
3.3.4 Průběh PCR.....	61
3.3.4.1 Amplifikace E2, E6 genu.....	62
3.3.4.2 Amplifikace genů E2, E1, L1, L2, E6.....	63
3.4 Zpracování dat.....	63
4. Výsledky	65
4.1 Kalibrační řady potřebné k metodě detekce integrace.....	65
4.2 Ověření navržených primerů pro metodu detekce integrace HPV	69
4.3 Optimalizace PCR.....	73
4.4 Testování metody.....	74
4.4.1 Genotyp HPV 52	74
4.4.2 Genotyp HPV 39	76
4.4.3 Genotyp HPV 58	76
DISKUZE.....	82
ZÁVĚR.....	85
CITACE.....	87

ÚVOD

Rakovina děložního čípku, onemocnění vyvolané především působením lidských papilomavirů (dále HPV), je globálně 2. nejčastějším nádorovým onemocněním mezi ženami.⁴¹

Incidence karcinomu cervixu v České republice patří mezi nejvyšší v Evropě. Každý rok je diagnostikováno 1050 až 1100 nových případů, 350 až 400 žen ročně na následky nemoci zemře (obr.1).²

I přes nyní rozšířenou možnost diagnostiky prekancerózních změn, které vlastnímu nádoru předcházejí a přístupnosti vyšetření děložního čípku, k poklesu incidence nedochází.³



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

Rakovina cervixu postihuje především ženy v produktivním věku, ovšem skoro 35 % všech pacientek je mladších 45 let. Vrcholy výskytu karcinomu děložního hrdla jsou dva, první mezi 35. - 39. a pak mezi 60. - 65. rokem života.²

Obecně platí, že prognóza rakoviny cervixu v časném stádiu je velmi dobrá. Nádory s hloubkou invaze 1-3 mm mají velice dobrou prognózu a prakticky nikdy nerecidivují. S pokročilostí choroby se však prognóza rapidně zhoršuje.⁴

V současné době je za nejdůležitější faktor vzniku karcinomu děložního čípku pokládána dlouhodobá infekce děložního čípku hrHPV, které je možné prokázat u více než 95 % případů tohoto nádoru. Invazivní karcinom je pak konečným stádiem dysplastických změn dlaždicobuněčného epitelu (CIN) nebo žlázového epitelu (CGIN).⁷

Vývoj karcinomu cervixu je velice pomalý. Primární infekce HPV je ve většině případů bez symptomů (až 90 % žen) a zpravidla do cca 8–12 měsíců sama odezní. U přibližně 10 % žen následně vznikají dysplastické změny v epitelu cervixu, u méně než 1 % dojde ke vzniku karcinomu in situ (CIS) a u méně než 0,2 % se vyvine invazivní cervikální karcinom.²

HPV infekce se nevyskytují pouze u žen, ale i u mužů, kterým indukují vznik genitálních bradavic, rakovinu konečníku i penisu.

Nejnovější a také nejspolehlivější metodou ochrany proti infekci HPV viry je vakcinace, jejímž cílem je vyvolat buněčnou imunitu. V kombinaci se screeningovými metodami, by mělo docházet ke snížení incidence i mortality nádorů cervixu. Je však více než pravděpodobné, že i přes zmiňovaná ochranná opatření, nenastane úplné vymizení nemocí, která jsou způsobena HPV. Imunizace organismu očkováním pacienta ochrání pouze před HPV, proti nimž je vakcína cílena, ochrana pomocí vakcinace pak nikdy nebude úplná a není ani zcela jasné, po jak dlouhou dobu budou očkovaní jedinci vakcínou chráněni. Taktéž v genomech HPV nelze vyloučit změny, které způsobí sníženou či neúplnou účinnost očkování.⁸

Proto i nadále zůstává výzkum vlivu HPV na vývoj karcinomu cervixu podstatným.

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo důkladné zmapování problematiky lidských papilomavirů a jejich vlivu na vznik karcinomu děložního čípku. Součástí cílu byl taktéž popis klinických projevů HPV infekce a její diagnostiky.

Cílem výzkumné části bylo lepší porozumění procesu integrace hrHPV viru do lidského genomu. Vzhledem k tomu že se integrace DNA papilomaviru objevuje již brzy v předrakovinových stádiích¹⁰⁷, bylo na proces integrace nahlíženo, jako na biomarker progresu prekancerózních lézí a vzniku samotného invazivního karcinomu.

Primárním záměrem bylo vytvoření laboratorní diagnostické metody, která by dokázala u pacientek s prekancerózními stavy (CIN1, CIN 2, CIN 3) efektivně rozpoznat integraci, stanovit riziko vzniku karcinomu a usnadnit tak stanovení konečné diagnózy lékařem. Tato metoda musí být dostatečně přesná, avšak nesmí být příliš složitá ani nákladná, aby bylo možné její pozdější zavedení do lékařské praxe.

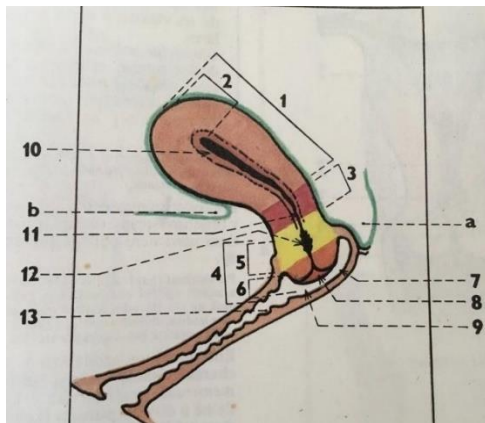
Ve výzkumné části jsem se zabývala genotypy HPV 58, 52 a 39. Jedná se o genotypy málo prozkoumané, však vysoce rizikové i poměrně často frekventované (např. HPV 58, 52 jsou velmi časté v Jižní Americe, Asii).⁷

TEORETICKÁ ČÁST

1. Anatomie děložního hrdla

Infekce lidskými papilomaviry se nejčastěji projevuje na zevních pohlavních orgánech, v pochvě, ale především na děložním čípku.⁷

Děložní hrdlo, též nazýváno cervix uteri, představuje dolní zúženou část dělohy válcovitého tvaru. Upíná se na něj pochva a dělí tak hrdlo na dvě části – část nad úponem a 1 cm dlouhou část pod úponem, též nazývanou čípek děložní, která vyčnívá do pochvy a je tak dobře přístupná vyšetření. Uprostřed vrcholu čípku rozlišujeme zevní branku děložní, která představuje otvor děložní dutiny do vaginy (obr.2).⁹



4. cervix uteri

5. část nad úponem

6. část pod úponem

8. zevní branka děložní

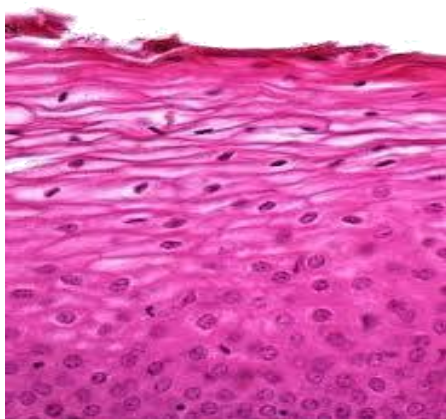
Obr.2 Děloha (uterus), sagitální řez (Čihák Radomír, 1998)

Funkce hrdla děložního spočívá v zabránění průniku infekce z pochvy, ale zároveň v umožnění úniku menstruační krve opačným směrem a v neposlední řadě průniku spermií na cestě k oocytu při oplodnění. Dále je pak součástí tzv. měkkých porodních cest, jimiž prochází plod při porodu.¹²

2. Dlaždicobuněčný epitel a výskyt HPV infekce

Povrch děložního čípku je tvořen dlaždicobuněčným nerohovatějícím epitelem (obr.3). Epitel se skládá z mnoha, do vrstev uložených, epiteliálních buněk s centrálně umístěným jádrem. Jeho funkce je primárně ochranná, zároveň se však podílí na udržování vaginálního pH.¹⁴

Přechod vícevrstevnatého dlaždicobuněčného epitelu ektocervixu do jednovrstevné výstelky endocervixu nemá zpravidla ostrou hranici mezi oběma epitely. Styčné místo obou epitelů se nazývá skvamo-kolumnární junkce. V oblasti skvamo-kolumnární junkce dochází k výrazné proliferativní aktivitě a k různým genetickým změnám bazálních buněk, které se pak mohou snadno diferenciovat v metaplastický dlaždicobuněčný epitel.⁷ Tato oblast je tedy nejvíce náchylná k infekci papilomaviry. Pokud je infekce indukována hrHPV, mohou tyto viry způsobit tvorbu dysplastických změn v metaplastickém epitelu, které v některých případech ústí až ke vzniku invazivního dlaždicobuněčného karcinomu.¹⁰ Mezi charakteristické rysy abnormalit endocervikálního epitelu patří zejména ztráta pravidelného uspořádání jader až překrývání jader; polymorfie buněk, ztráta soudržnosti buněk a tvorba buněčných shluků. Pro maligní nádory je pak typická tvorba obrovských shluků buněk (grouping), palisádové uspořádání buněk, pseudožlázové útvary a změna tvaru a okrajů buněčných shluků.⁴² Na rozdíl od dlaždicobuněčného epitelu, epitel jednovrstevný cylindrický, není přirozeným sídlem HPV infekce.⁵²



*Obr.3 Charakteristický histolgický obraz stěny poševní
(www.moodle.lfhk.cuni.cz)*

3. Lidské papilomaviry

Papilomaviry (obr.5) jsou fylogeneticky velice starou rodinnou neobalených dsDNA virů⁴⁷, infikující epitelální tkáň obojživelníků, ptáků, plazů a savců. Téměř všechny typy HPV jsou druhově specifické, nedochází tedy k mezidruhovému přenosu infekce.⁷ Podle svého onkogenního potenciálu jsou HPV viry děleny do 2 skupin: HPV viry s nízkým onkogenním potenciálem (low risk), způsobující benigní nádory typu kodylomat a papilomů, a HPV viry, s markantně vyšším potenciálem (high risk) pro tvorbu invazivního karcinomu (obr.4). Právě tyto vysoko rizikové viry stojí za vznikem až 95% všech nádorů cervixu.²³

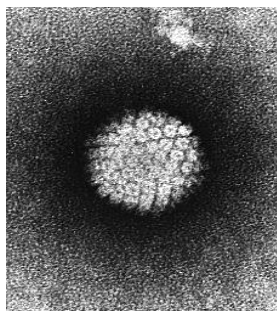
Association with cervical cancer ¹	Genotypes
Low-risk	<ul style="list-style-type: none">• Most common: 6 and 11• 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 and CP6108
Probable high-risk	<ul style="list-style-type: none">• 26, 53 and 66
High-risk	<ul style="list-style-type: none">• Most common: 16, 18• 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82

Obr.4 Onkogenní potenciál jednotlivých typů HPV (www. helicase.pbworks.com)

Human papilloma virus (HPV) je vir spadající do samostatné rodiny papillomaviridae.²⁴

Typ je tradičně zaužívaným taxonem v klasifikaci papilomavirů; je tvořen papilomaviry které se od geneticky jim nejbližších typů liší v nukleotidové sekvenci L1 genu o 10–25 %.⁷

Současně je popsáno 118 lidských typů HPV virů.⁷ Více než 40 druhů HPV virů je šířeno formou sexuálního styku a u 13 genotypů (hrHPV) je pozorovaná přímá souvislost se vznikem karcinomu. Ostatní formy papilomavirů, nejsou přenášeny pohlavním stykem a jsou odpovědné za vznik non genitálních bradavic.²²



Obr.5 Lidský papilomavirus pod elektronovým mikroskopem (www.wikiskripta.eu)

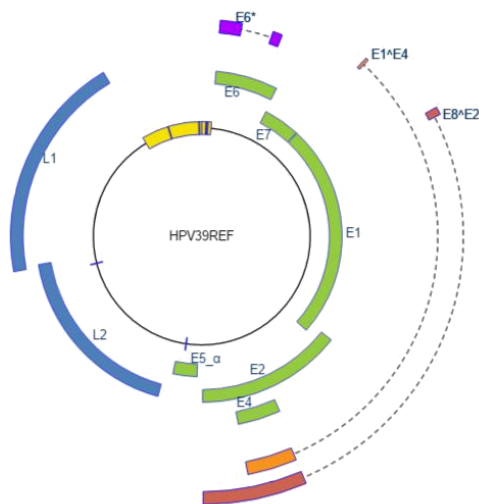
3.1 Organizace genomu lidských papilomavirů

Genom HPV (obr.6) obsahuje cirkulární dvouvláknovou DNA, jejíž délka se pohybuje od 7400 do 8200 párů bází. Tato DNA je replikována v jádrech infikovaných keratinocytů v podobě extrachromosomálních plazmidů.²⁵

Genom může být rozdělen do 3 hlavních oblastí: časné, pozdní a nekódující oblasti. Zmiňované části jsou od sebe odděleny dvěma polyadenylačními sekvencemi. Časný region (early region) zaujímá asi 50 % celkového genomu a kóduje 6, či více čtecích rámců (proteiny E1,E2 a E4-E7).²⁶ Pozdní region (late region) kóduje 2 čtecí rámce (L1 a L2) a pokrývá skoro 40% genomu viru.²⁷ Regulační region, oblast nekódující proteiny, obsahuje vazebná místa pro virové proteiny E2 a E1, kde začíná replikace DNA viru, dále pro promotory (P1,P2,P3 a vedlejší P4), které regulují expresi onkoproteinů E6 a E7.²¹ Regulační region(URR, LCR) taktéž obsahuje vazebná místa pro transkripční faktory a další regulační proteiny, jedná se o segment dlouhý 850bp a představující zbylých 10% genomu.⁷

Jedním z podstatných rozdílů mezi low risk a high risk HPV viry je nepřítomnost P2 promotoru u hrHPV virů, u kterých je tedy translace proteinu E7 zajištěna alternativním způsobem, sestříhem messenger RNA (mRNA) z regionu kódující protein E6.⁷

Transkripce DNA probíhá pouze ve směru 5' → 3'.²



Obr.6 Cirkulární schéma genomu HPV 39 (www.pave.niaid.nih.gov)

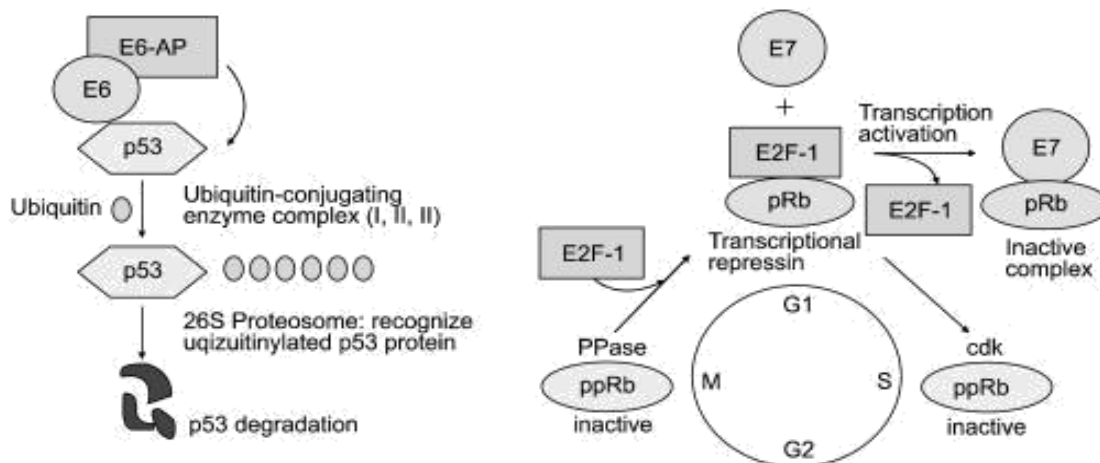
3.1.1 Funkce virových proteinů E6 a E7

Vysoce rizikové viry (hrHPV) mají schopnost navodit onkogenní transformaci buňky prostřednictvím interakce svých onkogenních proteinů E6 a E7 a regulačních proteinů buňky.⁴²

Hlavní funkcí virového proteinu E6, který je tvořen cca 150 aminokyselinami²⁸, je interakce s proteinem p53, mezi jehož hlavní funkce patří regulace buněčného cyklu v kontrolních bodech G1 a G2 a taktéž regulace přechodu buňky do apoptické dráhy.²⁹ Protein p53 patří mezi reparační proteiny, tzv. DDR (DNA damage response) proteiny. V případě značného poškození DNA, p53 aktivuje signální dráhy, vedoucí k programované buněčné smrti.⁴⁰ Protein E6 se pomocí ubikvitin-ligázy E6AP váže na tumor supresorový protein p53, což ústí k degradaci proteinu p53 v proteasomech a následné ztrátě kontroly buněčné proliferace a rovněž k destabilizaci genomu.³⁰ E6 protein tedy způsobuje inhibici funkce p53 a nepřímo potlačuje apoptózu (obr.7).²⁸ Funkcí proteinu E6 je taktéž degradace proteinů GAP, to pak vede k narušení přenosu signálu G-proteiny, a rovněž reaktivace genu katalytické jednotky telomerázy (hTert), čímž nastává immortalizace buněk.⁷ Taktéž degradace proteinů GAP, to pak vede k narušení přenosu signálu G-proteiny, a rovněž reaktivace genu katalytické jednotky telomerázy (hTert), čímž nastává immortalizace buněk.⁷ V souvislosti s virovým proteinem byla popsána taktéž deaktivace proapoptických proteinů Bak³¹ a Bax³². Samotný protein E6 je schopen *in vitro* immortalizovat buňky prsní žlázy a společně s virovým proteinem E7 je rovněž schopen immortalizovat keratinocyty děložního čípku.⁷

Hlavní funkcí virového proteinu E7, který je tvořen přibližně 98 aminokyselinami, je reaktivace buněčného cyklu v diferenciovaných keratinocytech dlaždicobuněčného epitelu, ty pak opět vstupují do S-fáze buněčného cyklu⁷. Zde je opět důležitá vazba virového E7 proteinu na pRb protein, který působí jako negativní regulátor buněčného cyklu a pomocí vazby na transkripční faktory E2F rodiny zabráňuje buňce opětovně vstoupit do buněčného cyklu a reguluje tak proliferaci. E7 virový protein způsobuje jeho degradaci v proteasomech, což má za následek opět ztrátu kontroly proliferace.³³ E7 protein taktéž vytváří komplex s cullin-2-ubikvitin ligázou, prostřednictvím něhož je pak pRb protein degradován na podkladě ubikvitinace.³⁴ Dále je E7 protein schopen v buňkách, které jsou mitoticky činné, indukovat aktivaci cyklin dependentních kináz 2, 4 a 6 nezávisle na cyklinu D.³⁵ Jedním z mechanismů aktivace je destabilizace funkce proteinu p21 a p27. Tyto proteiny za běžných okolností inhibují aktivitu cyklin dependentních kináz.⁷ Narušení funkce proteinu pRb, p21 a p27 způsobené činností virového proteinu E7 má za následek zvýšenou expresi proteinu p16, který za normálních okolností zastavuje, pomocí inhibice cyklin dependentních kináz, buněčný cyklus v G1 fázi³⁶, jeho působení je však v momentě narušení buněčných drah neúčinné.⁷ Větší množství proteinu p16 je zjištělné pomocí imunohistochemie, je tedy možné jej využít jako nepřímý ukazatel hrHPV infekce.³⁷

Degradation and inactivation of tumor suppressor p53 and pRb HPV E6 and E7



Obr.7 Schéma procesu degradace a inaktivace proteinu p53 a pRb virovými proteiny E6 a E7 (Eun-Kyoung Yim et al., 2005)

3.1.2 Funkce virových proteinů E1 a E2

Primární společnou funkcí virových proteinů E1 a E2 je zajištění replikace virové DNA.⁴⁰

E2 je dimerický protein, který je esenciální pro virovou replikaci *in vivo*.⁴³ Tento protein se váže na místo začátku replikace DNA viru v regulačním regionu jeho genomu.⁷

E1 je protein uspořádaný do dihexamerického tvaru, odpovídající enzymu DNA helikáza.⁴⁰ Jedná se o jediný enzym, který je kódován virovou DNA, všechny zbývající enzymy a regulační proteiny, nutné pro replikaci DNA viru, jsou poskytovány hostitelskou buňkou. Tato skutečnost je pak důvodem, proč je velmi obtížné vyvinout selektivní inhibitory replikace HPV.⁷

Virový protein E2 taktéž zajišťuje správné rozdělení virových plazmidů při dělení buňky do buněk dceřiných a rovněž přispívá k udržení jejich stability. Tímto způsobem je pak umožněno přetrvávání infekce. Protein E2 se také podílí na regulaci dalších virových genů, jelikož se jeho vazebné místo částečně překrývá s promotorem P1.⁷ Významná je především schopnost potlačovat transkripci onkogenů (genů podporujících buněčnou proliferaci).⁴⁵

Protein E1 jako DNA helikáza společně s DNA polymerázou a s proteinem RPA, vázajícím jednovláknovou DNA, zajišťuje replikaci a elongaci nového DNA řetězce. Správné načasování funkce a aktivita proteinu E1 je ovlivňována transportním systémem, který pomocí cyklinů a kináz řídí jeho přesun z cytoplasmy do jádra hostitelské buňky.⁷

Produktivní cyklus rozmnožování papilomavirů s tvorbou nových virionů nastává ve střední a horní vrstvě *stratum spinosum* dlaždicobuněčného epitelu, a to v buňkách které ještě nejsou diferenciovány do podoby plochých keratinocytů.⁴⁵

HPV replikace taktéž způsobuje dvojřetězové zlomy DNA v genomu viru, což ústí k produkci substrátů pro integraci DNA HPV do genomu hostitelské buňky.⁴⁰

Přechod z předrakovinových lézí do invazivního karcinomu (SCC) je ovlivňován taktéž expresí E2 proteinu.⁴¹

Proteiny E2 a E7 již nejsou exprimovány v totožném množství. Dochází k narušení exprese E2 a virový protein E7, společně s proteinem E6, je tedy exprimován mnohonásobně více. Replikace viru neprobíhá a dochází k integraci virového genomu do hostitelské DNA.⁴⁴ Virový protein E2 je tedy odpovědný za represi transkripce virových onkogenů,⁴⁵ a jeho absence je důvodem pro vznik genomové nestability a podpoření karcinogeneze cervikálních lézí.⁴⁴

3.1.3 Funkce virového proteinu E1/E4

Virový protein E1/E4 je v rámci HPV genomu proteinem s největší variabilitou a jeho funkce ještě nebyla zcela objasněna.⁷ Z nových poznatků se však usuzuje, že tento protein je podstatný pro maturaci a replikaci viru a je exprimován až v pozdních stádiích infekce.⁵⁶ Virový protein

E1/E4 je schopen způsobit zástavu buněčného cyklu v G2 fázi pomocí navázání komplexu cyklinu B s cyklin dependentní kinázou 1 na cytokeratinová filamenta v cytoplazmě buňky.⁷ Tento protein také napomáhá uvolňování nově vzniklých virionů.⁴⁵

Transkripce mRNA začíná v promotoru P3 a končí ve čtecím rámci E4. Následně dochází k vystřížení různě dlouhého úseku mediátorové RNA a výsledný protein je tak tvořen aminokyselinami kódovanými čtecím rámcem E1 a E4.⁷ K expresi E4 proteinu dochází v již diferenciováných infikovaných buňkách.⁴⁹ V porovnání s ostatními virovými proteiny je E1 syntetizován v největším množství a tvoří přibližně 90 % transkriptu viru. Z tohoto důvodu je v benigních lézích tento protein přítomen především v buňkách vyšších vrstev epitelu, které obsahují velké množství DNA viru.⁷ Konkrétně je E1 společně s cytokeratinem buněk lokalizován v nejtlustší vrstvě epidermis *stratum spinosum*.⁴⁵

3.1.4 Funkce virového proteinu E5

Virový dimerický protein E5 je lokalizován v membráně endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu hostitelské buňky. Vzhledem k tomu, že čtecí rámec E5 není u některých typů papilomavirů přítomen, předpokládá se, že tento virový protein nebude pro životní cyklus HPV viru nezbytný. Protein E5 taktéž umožňuje infikovaným buňkám uniknout z imunitního dohledu, čímž společně s proteiny E6 a E7 tlumí imunitní odpověď hostitele.⁷

Funkce virového proteinu E5 není ještě zcela prozkoumána, avšak předpokládá se, že tento protein hraje důležitou roli zejména v brzkých fázích karcinogeneze.⁵⁰ Virový protein E5 interaguje s membránovými receptory buňky (EGF, PDGF), a tím dochází ke stimulaci buněčné proliferace v HPV infikovaných buňkách.⁵⁶ V buňkách invazivního karcinomu již tento protein exprimován není.⁷

3.1.5 Funkce virových proteinů L1 a L2

Virové proteiny L1 a L2 vznikají translací dlouhého vlákna mRNA, které vzniká transkripcí čtecích rámců E1, E5, L1 a L2.⁷ Tyto proteiny jsou exprimovány až v pozdních stádiích HPV infekce.⁵⁶

Protein L1 je významný především jako důležitá součást virové kapsidy, kterou tvoří z 90 % procent.⁴⁷ L1 se samovolně uspořádává do kapsid, které jsou morfologicky neodlišitelné od prázdných virových partikulí (neobsahující genetický materiál) – tzv. pseudopartikulí (VLD – virus like particles). Protein L2 výrazně ovlivňuje umístění těchto pseudopartikulí, které se pak nachází v jádře infikované hostitelské buňky a jsou základní složkou virové kapsidy. Tvar a stabilitu této kapsidy pak pomáhá udržovat virový protein L2. Zároveň je L2 protein velmi podstatný pro tvorbu infekčních virových partikulí. Samotná prostorová struktura viru hraje velmi podstatnou roli při navázání viru na hostitelskou buňku.⁴²

Částice, které jsou tvořeny proteinem L1 jsou základem pro výrobu vakcín proti HPV infekci.⁷

3.2 Přenos papilomavirů

Papilomaviry se prostřednictvím kůže šíří přímým kontaktem, přičemž dochází k tomu, že se virus zachytí na místech drobných kožních trhlin a odřenin. Takové nepozorovatelné poranění může přímo souviset s pohlavním aktem.⁴⁵

Lidské papilomaviry jsou celosvětově nejčastěji přenášenou pohlavní infekcí, celoživotní riziko nákazy HPV je u žen až 80 %. Přenos HPV infekce při heterosexuálním pohlavním styku je možný obousměrně mezi partnery.

Rizikovým faktorem je tedy časté střídání sexuálních partnerů⁴⁵ a imunosuprese z jakékoliv příčiny, či indukována přítomností viru HIV.⁶¹

3.3 Vývojový cyklus HPV virů

3.3.1 Infekční cyklus papilomavirů

Jak již bylo řečeno, lidské papilomaviry infikují keratinocyty především v oblasti skvamokolumnární junkce.⁴⁵ Buňky skvamokolumnární junkce se mohou diferenciovat jednak v keratinocyty, ale také v buňky cylindrického epitelu, popř. v dysplastické změny vyvolané působením hrHPV virů.⁷

Základním předpokladem pro vstup viru do buňky je vazba na receptor lokalizovaný v buněčné membráně. Po dlouhou dobu bylo předpokládáno, že dochází k navázání papilomaviru přímo na keratinocyty. Výsledky relativně nových studií *in vivo*, však dokazují že primárním místem vazby je bazální membrána epitelu, navázání HPV viru na keratinocyt nastává až později.⁷ Velmi podstatná je zde funkce virového proteinu L1.⁴² Díky tomuto proteinu je viru umožněna vazba na heparansulfát, který je přítomen v buněčné membráně.⁵³

Po navázání virového proteinu L1 na heparansulfát dochází v důsledku konformační změny virové kapsidy k odhalení specifického místa v molekule L2 proteinu, ve kterém je tento protein následně štěpen furinem přítomným na povrchu hostitelské buňky. Dochází k dalším změnám konformace virové kapsidy, které vedou k uvolnění vazby viru z primárních receptorů a navázání na, zatím neznámé, sekundární receptory a k internalizaci HPV viru do buňky hostitele.⁷

Mimo keratinocyty dokáží HPV viry infikovat taktéž Langerhansovy buňky. Tyto dendritické buňky, bránící lidské tělo před patogeny vstupujícími přes pokožku, jsou důležitou složkou imunitního systému.⁵⁵ Tato interakce je tedy důležitá pro imunitní odpověď organismu na přirozenou infekci či očkování.⁵⁴

Po navázání viru na sekundární receptory dochází k vniknutí viru do nitra buňky.⁷ Kompletní struktura HPV virionu není přizpůsobena na proniknutí jadernými póry, proto v průběhu transportu dochází k rozrušení virové kapsidy štěpením disulfidických můstků.⁵⁷

Vlastní transport virového genomu do jádra hostitelské buňky je zprostředkován pomocí heterodimerů Kap α 2 β 1 a systémy Kap β 2, Kap β 3.⁵⁸

3.3.2 Replikační cyklus papilomaviru

Replikační cyklus viru probíhá v jádře infikované buňky.⁶² Replikace virové DNA začíná oddělením histonů od obou vláken virové DNA, tomu předchází uvolnění pnutí dvojvlákna dsDNA, které bývá mašlovitě stočené kolem pomyslné dlouhé osy.⁵⁹ Virusem kódovaný protein E1 se váže na sekvenci Ori, následně asociuje s proteiny komplexu DNA polymerázy a taktéž s proteinem E2. Nově replikovaná DNA je pak uchovávána ve formě extrachromosomálních plazmidů.⁴⁵

Intezita replikace virové DNA je velmi nízká v bazálních/suprabazálních keratinocytech, v průběhu jednoho buněčného cyklu je replikována pouze jednou. Celkový počet virových DNA se v již zmíněných keratinocytech pohybuje kolem 20 až 100 kopií.⁴⁷ Tento počet je relativně stálý díky regulaci exprese virových proteinů E1 a E2, pomocí vlastního proteinu E2.⁷ Jakmile se buňka přesune do vrstvy stratum spinosum, přestává se dělit a nastává proces diferenciaci.⁶² Právě v diferencujících se buňkách v *stratum spinosum* dochází primárně k replikaci virové DNA.⁴⁵ V jedné hostitelské buňce vzniká až tisíc kopií virové DNA.⁷

Buňky, které se dělí, zaujímají maximálně jednu třetinu epitelu. V horních vrstvách se buňky nachází v různém stádiu diferenciaci. Pokud infekce vysoko rizikovými typy přetrvává dlouho, může docházet ke vzniku závažných intraepiteliálních lézí (HSIL). Tyto léze jsou typické replikací nezralých epiteliálních buněk v celém objemu epitelu, které se již dále nediferencují.⁶²

3.4 Integrace HPV viru do hostitelské DNA

Integrace genomu lidského papilomaviru do DNA hostitelské buňky (obr.8) je jedním z dějů stojících na počátku nádorové progresse.⁶⁶ Vysoce rizikové integrované papilomaviry se nejčastěji nachází v cervikálních neoplaziích třetího stupně (CIN 3).⁶⁴ V CIN 2 či CIN 1 se papilomavirus vyskytuje primárně v episomální formě, i přes to ho však můžeme v těchto stádiích relativně často pozorovat taktéž v integrované formě.⁶⁵

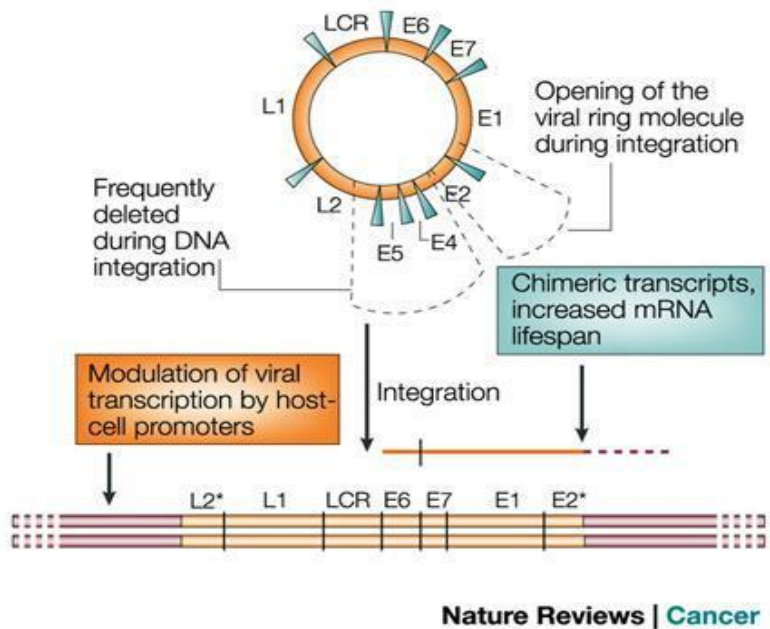
Při sestavování této práce jsem vycházela také ze článku (*Zheng Hu et. Al, 2015*). Pokud budeme uvažovat výsledky tohoto výzkumu, integrace viru HPV 16 se vyskytovala v 50 % již v CIN 1 a v 71 % v CIN 3. Integrace papilomaviru pak byla rozpoznána až v 87 % spinucelulárních karcinomů. Je zde tedy patrná souvislost s progresí cervikálních lézí, vyšším rizikem vzniku karcinomu a integrací viru do genomu.⁶⁵

Integrace DNA viru do chromosomů hostitele nastává v dělicích se buňkách rohovatějšího i nerohovatějšího dlaždicovitého epitelu. Výsledky nových studií poukazují na to, že ačkoliv dochází k integraci do genomu hostitelské buňky náhodile, u HPV 18 se místo integrace nachází v blízkosti protoonkogenu *c-myc*.⁷³

Ke zlomu cirkulární dsDNA viru nejčastěji dochází v oblasti, která kóduje protein E2, čímž nastává snižování pravděpodobnosti produktivního rozmnožování viru v hostitelských buňkách. Výsledkem je pak zachovaná způsobilost navodit transformaci bez možnosti produktivní replikace, což je stav ideální pro vznik karcinomu. Stav chronické neproduktivní infekce HPV je tototíž spojený s expresí virových proteinů E6, E7, která je při produktivní replikaci viru inhibována pomocí proteinu E2. Dochází tedy k nadměrné transkripci genů E6 a E7.⁷

Ke zvýšení hladiny E6 a E7 přispívá také zvýšená stabilita mRNA transkriptů těchto genů.⁶⁷

Již popsaný stav následně vede ke vzniku trvalé proliferace.⁴⁵ Pomocí těchto časných proteinů, papilomaviry udržují stav imortalizace hostitelské buňky, E6 a E7 současně vyřadí z činnosti tumorsupresorové proteiny p53 a retinoblastomový protein pRb.⁶⁸



Obr.8 Schéma štěpení cirkulární DNA viru v oblasti E2 genu a následní začlenění neštěpené oblasti do DNA hostitele. Virové transkripty jsou modulovány pomocí promotorů hostitelské buňky. (Harald zur Hausen, 2002)

Gen *p53* kóduje protein, který je životně důležitý v ochraně před buňkami s poškozenou DNA.⁴⁶ Pokud k takovému defektu dojde, protein p53 se váže na DNA a aktivuje se. Aktivace p53 pak vede k programované apoptóze buňky.⁴⁰ Pokud je na protein p53 naváže virový protein E6, podléhá strukturální změně a nedokáže se již vázat na DNA za účelem apoptózy. Mutovaná buňka se může dále dělit.¹⁴

Jak již bylo uváděno, gen *pRb* kóduje protein, který potlačuje schopnost replikace buňky. Protein pRb zabraňuje pomocí inhibice postupu z G1 do S fáze. Inaktivace tohoto proteinu pomocí E7, ústí opět v nekontrolovatelnou proliferaci.⁴⁵ Samotná integrace tedy vede k blokádě apoptických mechanismů buňky a blokádě syntézy regulačních proteinů, která vede k nekontrolovatelné mitotické aktivitě¹⁴, deregulaci buněčného cyklu a maligní transformaci.⁶⁹

3.5 Imunitní odpověď organismu a osud HPV infekce

3.5.1 Imunitní odpověď organismu na HPV infekci

Infekční viriony se kompletují v horních vrstvách sliznice a uvolňují se z odumírajících buněk.⁶² Infekce papilomaviry je pouze lokální a vzhledem k tomu, že k infekci stačí pouze malé poškození integrity bezcévního dlaždicobuněčného epitelu, bez narušení jeho bazální membrány, nedochází k viremii.⁷ Papilomaviry taktéž nezpůsobují rozpad infikovaného keratinocytu, který by mohl stimulovat imunitní systém. Také aktivace buněk imunitního systému v regionálních lymfatických uzlinách je minimální.⁷⁰ Přes tyto fakta, však k imunitní reakci organismu dochází.

Doba, která uplyne od infekce k indukci specifické imunitní reakce má rozpětí od týdnů po měsíce.⁶²

Imunitní odpověď se rozvíjí především proti kapsidovému proteinu L1, pomocí syntézy, proti němu namířených, neutralizačních látek.⁶⁵ Tyto protilátky jsou syntetizovány asi 8–16 měsíců po infekci.⁶² U mnohých jedinců, ale imunitní odpověď může být velmi nízká, jelikož rozsah kontaktu virionů s antigenem prezentující buňky (APC) je nedostatečný.⁶⁵

Papilomaviry se vymaňují z kontroly imunitního systému, tím že narušují signální dráhy, které jsou spojeny s interferony, které za normálních okolností stimulují antivirovou aktivitu imunitního systému. V průběhu infekce papilomaviry dochází ke snižování počtu Th-1 lymfocytů, mezi jejichž primární úlohy, patří produkce imunostimulačních cytokinonů. Naopak dochází ke zvyšování počtu Th2-lymfocytů, které tvoří cytokiny tlumící imunitní odpověď.⁷

Imunitní systém každého jedince se mírně liší, z toho důvodu může být i klinický průběh HPV infekce u každé osoby rozdílný.⁷¹ Následný osud HPV infekce je pak výsledkem aktivity a účinnosti imunitního systému hostitele.⁷

3.5.2 Průběh a osud HPV infekce

Nejčastějším případem průběhu HPV infekce je její časná eliminace imunitním systémem hostitele. Většina infekcí cervixu je potlačena nebo zcela eliminována do 1 až 2 let od vzniku nákazy.⁷⁴

Pokud nedochází k regresi HPV infekce, dochází k její perzistenci (stálost) nebo se infekce šíří dále čili nastává její progresse.⁷²

V případě přetrvávající infekce, může imunitní systém hostitele, tuto infekci zcela kontrolovat.

Virus je přítomen ve formě extrachromosomálních plasmidů v infikovaných bazálních keratinocytech. Infekce je zcela bez klinických příznaků a může takto přetrvávat v latentní formě až několik let. Při imunosupresi, však může nastat reaktivace viru a vznik aktivní infekce.⁷

Infekce může být taktéž kontrolována imunitním systémem pouze částečně, přičemž dochází k tvorbě virionů pouze v omezeném počtu keratinocytů. Výsledek jsou pak dlaždicobuněčné benigní papilomy a intraepiteliální neoplazie prvního a druhého stupně.⁷

Pokud dochází k následné progresi infekce, může nastat nádorová transformace, která přes jednotlivá stádia neoplazií ústí až ke vzniku invazivního karcinomu.⁵⁶

Inkubační doba pro vznik karcinomu je odhadována na 20 a více let, u imunosuprese se jedná o proces kratšího trvání.⁷²

3.5.3 Očkování proti HPV infekci

Jedním z největších úspěchů medicíny v oblasti prevence proti papilomavirové infekci, je objev očkovací vakcíny. Očkování chrání před nákazou papilomaviry a tím zabraňuje vzniku karcinomu děložního čípku.⁷⁵ Nyní jsou dostupné dva typy vakcín Silgard a Cervarix.⁶¹

Po očkování dochází k rozvoji specifické humorální imunity namířené proti genotypům viru zastoupených ve vakcíně.⁴ Základem obou vakcín jsou virům podobné částice VLP (virus like particle), které jsou tvořené pouze virovým proteinem L1, získané biotechnologicky z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.⁷

Obě vakcíny chrání před hrHPV 16 a 18, které jsou globálně nejrozšířenějšími typy papilomavirů.⁷⁵ Tyto vakcíny jsou určeny primárně dívkám ve věku 9-14 let.⁷⁶ Není vyloučena ani vakcinace chlapců ve věku 11-12 let vakcínou Silgard.⁷⁷ V ideálním případě by měla být vakcína podána dívkám před prvním pohlavním stykem.⁷⁶

Obě vakcíny jsou velmi účinné, taktéž nemohou způsobit HPV infekci ani rakovinu samotnou, jelikož VLP neobsahují virovou DNA.⁷⁸

4. Klinické projevy infekce papilomaviry

Klinické projevy HPV infekce se dělí do tří skupin, a to na latentní, subklinickou a klinickou formu. Latentní formu lze prokázat pouze HPV testem, popřípadě průkazem protilátek proti lidskému papilomaviru.³ Subklinická forma, která převažuje, má projevy, které jsou zjistitelné pomocí kolposkopického, cytologického a histologického vyšetřením. Klinickou formu lze detekovat pouhým okem.⁷⁹

4.1 Genitální bradavice

Genitální bradavice, též označovány jako kondylomata (condyloma acuminatum), jsou nejfrekventovanějšími nenádorovými transformacemi epitelu mezi muži i ženami.⁴⁷ Jedná se o drobné bradavičnaté útvary, které jsou u žen lokalizovány především v oblasti zevních pohlavních orgánů a cervixu.⁷² Na děložním čípku jsou detekovány především ploché typy bradavic a je poměrně náročné tyto kondylomata klinicky rozlišit od cervikálních neoplazií.⁷

U mužů se tyto nálezy vyskytují především v oblasti kůže penisu a glans penisu.⁸⁰

Původcem jsou nízkorizikové papilomaviry, především HPV 6 a HPV 11, jejichž výskyt je poměrně frekventovaný.⁸¹

4.2 Prekancerózy

Prekancerózy jsou přednádorové transformace, předcházející vzniku samotného karcinomu. Jedná se o poruchu vyžívání epitelu s jadernými a buněčnými nepravidelnostmi, ztrátu polarizace doprovázenou zvýšenou mitotickou aktivitou.⁸² Prekancerózy jsou poměrně snadno léčitelné, mohou však recidivovat při perzistenci viru a nebo vzniknout po letech stejným mechanismem jako nové onemocnění.⁶¹ Mezi rizikové faktory vzniku prekancerózy patří přítomnost hrHPV, imunosuprese a také sexuální promiskuita.⁸³

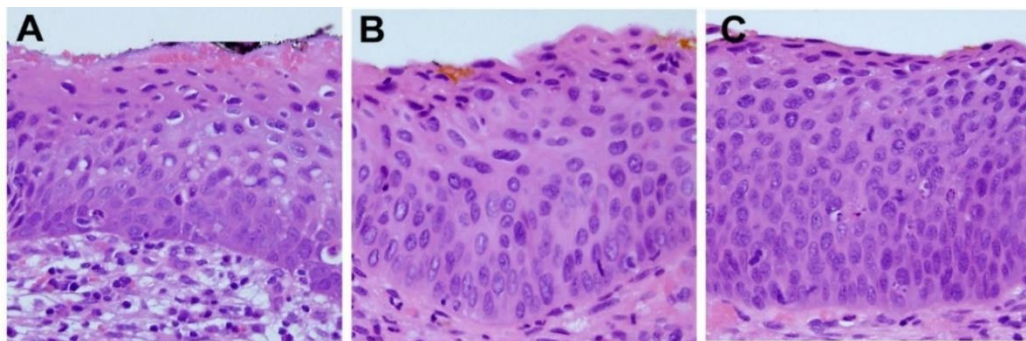
4.2.1 Histopatologický grading

Při určování nálezu dle jeho závažnosti (CIN 1, CIN 2 a CIN 3) je nejdůležitějším kritériem výška epitelu, který má ještě zachovanou diferenciaci.⁸⁴ Stupeň léze se tedy stanoví podle podílu, které zaujímají neoplastické nediferencované buňky. Čím více epitel léze připomíná klasický epitel, tím menší bude její stupeň. (obr.9).⁸⁶

U CIN 1 dochází ke vzniku patologických změn (poruchy maturace, jaderné atypie atd.) v dolní 1/3 epitelu, u neoplazií středního stupně (CIN 2) v 2/3 epitelu. CIN 3 již tvoří dysplastický epitel v celém rozsahu. V případech s výraznou poruchou maturace a jadernými atypii těžkého stupně lze CIN 3 hodnotit taktéž jako *carcinoma in situ*.⁸⁷ Posledním stádiem, následujícím po CIN 3 je invazivní skvamózní karcinom (SCC), který již sice prorůstá do okolí a infiltruje vazivo, ale nemetastazuje do lymfatických uzlin. Pokročilejší nádory už vykazují metastáze v regionálních lymfatických uzlinách.⁴⁵

V oblasti cervixu, krytého cylindrickým epitelem lze transformace povrchového epitelu dělit totožným způsobem jako u epitelu dlaždicového. Pro tyto léze je zavedeno označení glandulární intraepiteliální neoplazie (CGIN).⁸²

Následné chování intraepiteliálních neoplazií může být trojí – perzistence, regrese nebo progres. ⁸⁶ U většiny, hrHPV viry vyvolanými, dysplazií dochází spontánně k regresi bez jakéhokoliv medicínského zásahu. Konkrétně dochází k regresi u 70 % CIN 1 do jednoho roku a u 90 % do dvou let. U CIN 2 nastává regrese v cca 50 % případů do dvou let, opět bez jakéhokoliv medikace či invazivního zákroku. Přibližně v 12 % u CIN 3 dochází k maligní transformaci, vedoucí ke vzniku karcinomu.⁸⁵ Je nutno tedy zdůraznit, že samotná přítomnost hrHPV virů, není přímým stoprocentním ukazatelem vzniku invazivního karcinomu. Právě z důvodu časté regrese neoplazie, je podstatné rozlišení mezi nálezem, vedoucím k indikaci lékařského zákroku, a nálezem vhodným pouze pro sledování gynekologem.



Obr.9 Histologický obraz epitelu, zleva CIN1, CIN2, CIN3 (www.dundemedstudentnotes.wordpress.com)

4.2.2 Cytologický grading

Cytologický grading je založen především na jaderných charakteristikách. Narůstající počet abnormálních buněk, společně s velikostí jádra, se zvětšuje s rostoucí tíží léze.⁸⁸ Hodnocena je tedy struktura jader, ale taktéž shluky buněk, a buněčná cytoplazma (tab.2).⁴² Nálezy na děložním čípku jsou klasifikovány podle Bethesda systému, jehož poslední modifikace proběhla v roce 2001.⁸⁸ Jsou rozlišovány na nízko rizikové dlaždicové intraepiteliální léze (obr.10), označovány jako LGSIL (low grade squamous intraepithelial lesion), a na vysoce rizikové léze (obr.11), HGSIL (high grade squamous intraepithelial lesion).⁷²

Stupně jaderné a cytoplazmatické maturace bývá vyjádřen pomocí nukleocytoplazmatického poměru (NC) v procentech (tab.1).¹⁴

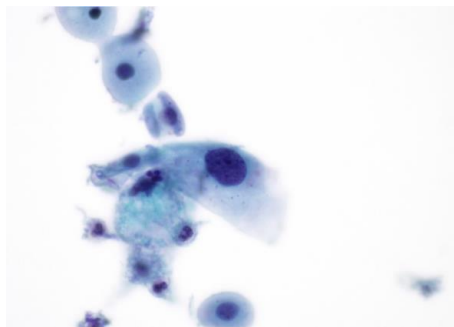
Normální intermediární buňky 25 %
LSIL (průměr 40%) < 50 %
HSIL (průměr 60%) > 50 %

Tabulka 1 Morfometrická kritéria pro nukleocytoplazmatický poměr založený na středním průměru v % (www.eurocytology.com)

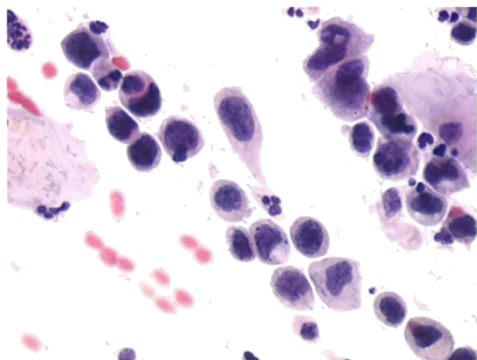
Cytolog při diagnostice rozliší abnormální změny dlaždicovitého a žlázoového epitelu od benigních transformací buněk.⁴² Pokud nelze nález zcela specifikovat používají se termíny ASC-US a ASC-H. Tyto změny jsou souhrnně klasifikovány jako atypické skvamózní buňky. Většina ASC je mezi normalitou a LSIL, a jsou označovány jako atypické buňky neurčitěho významu (ASC-US). V menšině případů se jedná o atypické buňky, kde nelze vyloučit H-SIL (ASC-H), jde tedy o nejistotu mezi benigními změnami a high grade lézemi.¹⁴

U žláznatých buněk cylindrického epitelu (endocervixu) rozeznáváme nálezy AGC-NOS a AGC-NEO. Obecně je však kategorie AGC považována za rizikovou, jelikož tyto nálezy jsou špatně hodnotitelné základním kolposkopickým vyšetřením a sensitiva cytologického screeningu je zde taktéž snížena.¹⁰⁴

Klasické cytologické obrazy high-grade lézí nejsou vždy v denní praxi vyjádřeny, a tak četné napodobeniny benigních a nádorových změn mohou vést k diagnostickým omylům.¹⁴ Nejvíce frekventované jsou falešně pozitivní výsledky.²¹



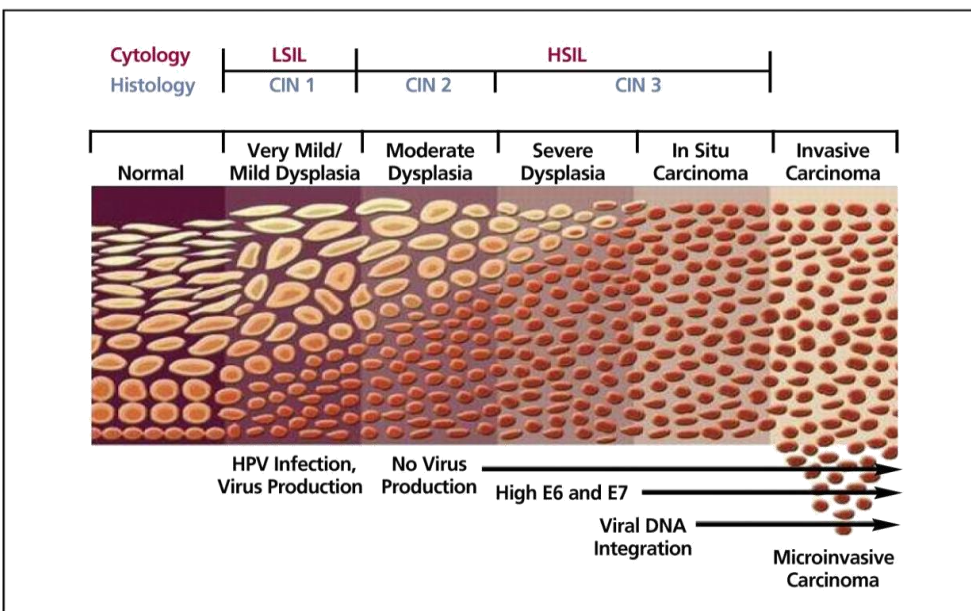
Obr.10 Cytologický obraz LG SIL. U lehké dysplazie lze pozorovat zvýšený NC poměr (40 % v uvedené buňce), hyperchromní chromatin, který je taktéž hrubší než u normálních buněk. (www.eurocytology.com)



Obr.11 Cytologický obraz HG SIL. U těžké dysplazie lze detekovat nepravidelný, hyperchromní chromatin, zvětšení jader a taktéž nárůst NC poměru (přes 50 %). (www.eurocytology.com)

Cytologická abnormalita	LGSIL	HGSIL
Jádro	zvětšené	výrazně zvětšené
Jaderný chromatin	granulární nebo opakní/koilocyty/	hrubě granulární
Jaderná membrána	může být nepravidelná	ztluštělá a obvykle nepravidelná
Mitózy	řídké	dosti časté
N/C poměr	středně zvětšený	výrazně zvětšený
Cytoplazma	téměř normální / dyskaryotické buňky/ perinukleární halo /koilocyty/	Výrazně abnormální, keratinizovaná a zvláště tvarovaná
Koilocyty	často	Mohou být přítomny u keratinizujících lézí

Tabulka 2 Souhrn cytologických znaků HGSIL a LGSIL; koilocyty jsou formou dyskaryotických buněk, jedná se o buňky s homogenními jádry bez jadérek, která jsou obklopena cytoplazmatickým projasněním. (www.hpv.cervix.cz)



Obr. 12 Progrese infekce papilomaviry v buňkách cervixu. Zleva doprava je znázorněna progresse původně normálních buněk epitelu. Dochází k nárůstu NC poměru v průběhu buněčné progresse dysplazie, vedoucí ke vzniku invazivního karcinomu. Je zde taktéž znázorněno prolínání histopatologického a cytologického gradingu (www.jaoa.org)

4.3 Maligní epitelové nádory cervixu

Epitel, který pokrývá děložní hrdlo, se vlivem infekce papilomaviry transformuje na maligní nádorové onemocnění.⁴⁷ Pokud není tento proces včas a dostatečně léčen, nastává šíření zhoubného procesu přes lymfatické cévy do dělohy, i do okolních orgánů.⁶¹

Právě dlouhodobá infekce sliznice děložního čípku vysokorizikovými papilomaviry, je v současné době pokládána za nejdůležitější faktor vzniku karcinomu.⁸⁹ Vysoko rizikové HPV viry byly detekovány u 99,7 % dlaždicobuněčných karcinomů a u 54-94 % adenokarcinomů.⁸⁸

Celosvětově nejčastějším typem HPV podílejícím se na vzniku nádorů je HPV 16, který je detekován ve více než 50 % případů, v dalších přibližně 30 % jsou přítomny především typy HPV18, HPV45 a HPV 31. Ve zbývajících 20 % případů pak HPV 33, HPV 52 a HPV 58. Není vyloučena ani přítomnost více typů HPV v dysplastických lézích a karcinomech, není však jednoznačné, do jaké míry tato skutečnost ovlivňuje průběh onemocnění. Výskyt jednotlivých typů papilomavirů je taktéž podmíněn geograficky. Například HPV 52 a HPV 58 jsou nejrozšířenější v Asii a Jižní Americe, vzhledem k tomu, že vakcína primárně proti těmto typům nechrání, je nutno počítat s nižší účinností očkování ve zmíněných oblastech.⁷ Dle publikace (Stefanie J. Klug et al, 2007) patří typy HPV 52 a 58 mezi nejvíce frekventované mezi Německými ženami. HPV 58 a 52 taktéž patří mezi typy virů, které jsou nejčastěji detekovány v těžkých cervikálních neoplaziích.¹⁰³

Nejrozšířenějším typem nádoru je spinocelulární karcinom (75 %), indukovaný z dlaždicovitého epitelu a etiologicky související s HPV infekcí.⁶¹ Jak již bylo zmíněno, vzniká progresí cervikálních neoplazií.

Časná stádia onemocnění, stejně jako prekancerózy, jsou asymptomatická. U již pokročilých invazivních karcinomů nastává krvácení, bolest, hematurie a vodnatý výtok z pochvy.⁶¹

Mezi hlavní rizikové faktory vzniku karcinomu patří především rizikové sexuální chování, za nejrizikovější faktor je považován nízký věk v době prvního pohlavního styku a promiskuita mužů i žen.⁷ Dále pak infekce HIV či obecně imunosuprese.⁹¹

5. Diagnostika HPV infekce

Infekci papilomaviry lze prokázat nepřímymi metodami mezi které se řadí primárně cytologické, histologické vyšetření a sérologická diagnostika. Mezi přímé metody se pak řadí především imunohistochemické a imunocytochemické postupy a hybridizace virové DNA.⁷² Nejčastěji se využívá diagnostiky onkologickou cytologií, histologickým vyšetřením a hybridizačními metodami.⁴⁵

5.1 Metody nepřímé

5.1.1 Histologické vyšetření

Histologická diagnostika informuje o stavbě tkání, buněk a principech jejich uspořádání.⁸⁷ Materiál na histologickou diagnostiku se získává pomocí biopsie, odnětím malého kousku cervikální tkáně.⁶¹

Dle histologických změn rozlišujeme několik stupňů cervikálních intraepiteliálních neoplazií podle závažnosti nálezu.

CIN 1 – mírná dysplazie

CIN 2 – střední dysplazie

CIN 3 – těžká dysplazie a *carcinoma in situ*⁴

Patologické změny charakteristické pro cervikální neoplazie bývají patrné i při reparačních procesech po destrukcích, excizních výkonech nebo při zánětech, infekcích a také fyziologické hyperplazii.⁸⁷ Problémy histologického, taktéž cytologického vyšetření jsou především falešně pozitivní (v menší míře falešně negativní) nálezy. K upřesnění diagnostiky mohou být tedy použity i jiné, imunohistochemické metody.¹⁴

5.1.2 Cytologické vyšetření

Cytologická diagnostika se zakládá na vyhodnocování dlaždicových, cylindrických, žlázových buněk⁷² a je považována za hlavní screeningovou metodu.⁶¹ Stěr z děložního hrdla a následné vyšetření je základem většiny screeningových testů, které umožňují detekovat přednádorové transformace a samotné karcinomy, a umožnit tak včasnou léčbu.⁷²

K hodnocení jednotlivých buněčných změn je v současnosti využíván Bethesda systém, který rozlišuje LGSIL (nízký stupeň léze) a vysoký stupeň intraepiteliální léze⁷²

Spolehlivost této metody závisí na kvalitním odběru, laboratorní technice a diagnostické zdatnosti laborantů.¹⁰² V České republice se její sensitivita pohybuje kolem 50-70%.⁹⁴ Může docházet k falešně pozitivním diagnózám ale taktéž k falešně negativním.¹⁴ Nevýhodou je zde vysoká falešná negativita výsledků vyšetření pacientů s buněčnými abnormalitami cervikálního a análního kanálu.⁷²

Vzhledem k tomu že samotná přítomnost hrHPV viru může být prekurzorem pro vznik invazivního karcinomu, metoda stanovení přítomnosti vysokorizikového papilomaviru (HPV testace), může být kombinována s cytologickou diagnostikou, pro zlepšení její sensitivity.¹⁴

5.1.3 Sérologická diagnostika

Sérologické metody využívají detekce neutralizačních protilátek vykazujících částečnou typovou specifitu. Tato diagnostika tedy informuje o tom, zdali se organismus s HPV infekcí již setkal.⁷²

Konkrétně protilátky proti virovým proteinům E6 a E7 jsou ukazatelem cervikálního karcinomu.⁷²

Sérologické metody se v praxi využívají velmi ojedinele. Jejich použití je omezeno z důvodu velmi obtížné kultivace papilomavirů ve tkáňových kulturách. Dalším úskalím této metody je její nespolehlivost, jelikož někteří pacienti nikdy nevytvoří detekovatelné množství protilátek.⁹⁵

5.1.4 Kolposkopie

Pomocí metody kolposkopie lze za užití binokulárního optického systému detekovat cévní a epitelové abnormality.⁴ K detekci se využívá především 3-5 % roztok kyseliny octové, který rozpustí hlen a zvýrazní patologické transformace epitelu.⁶¹ Primárním cílem této diagnostiky je odhadnout rozsah a stupeň léze a určit místo odběru biopsie pro histologické vyšetření.⁶¹

5.2 Metody přímé

5.2.1 Imunohistochemické metody

Imunohistochemická diagnostika využívá reakce specifických protilátek s proteiny HPV viru, které následně detekuje. Jednou z nejrozšířenějších metod tohoto typu je imunohistochemické stanovení proteinu p16, kódovaného genem *CDKN2A*.⁷ Za běžných okolností je tento protein v buňce exprimován v imunohistochemicky nedetekovatelném množství. Pokud působením virových proteinů E6 a E7 dochází k narušení funkce buněčných proteinů pRb a p53, je protein p16 exprimován v mnohonásobně větším množství, které je již detekovatelné pomocí imunohistochemie.⁷

Protein p16 je senzitivním, avšak ne zcela specifickým ukazatelem aktivní replikace hrHPV. Pro zvýšení specifity vyšetření je tedy tato metoda kombinována s detekcí jiných markerů.⁷ Mezi tyto ukazatel patří například proliferační marker *Ki-67*, který je silně exprimován u CIN jako následek zvýšené proliferace⁹⁹, nebo *nm23*.⁷

V souvislosti s maligní transformací epitelu cervixu lze detekovat více biomarkerů. Většina však není v diagnostické praxi využívána.

MYC je buněčný onkogen, považován taktéž za proliferační marker, jelikož jeho hladiny stoupají v závislosti na stupni CIN⁹⁸

Survivin je protein inhibující buněčnou apoptózu. V průběhu karcinogeneze je zaznamenána jeho zvýšená exprese.⁹⁷

GLUT1, CAIX, HKII jsou proteiny, jejichž zvýšená exprese byla taktéž zaznamenána v karcinomech cervixu. Potenciálně mohou být také uvažovány jako biomarkery progresu neoplazií.¹⁰⁰

5.2.2 SCCA

SCCA je sensitivní marker recidivy onemocnění a má tedy prognostický význam u pacientek, které již onemocnění prodělali. Recidivy se nejčastěji projevují během dvou let po ukončení terapie. Sérová pozitivita markeru (zvýšení jeho hladiny) je detekována u 80 % recidiv.¹⁰¹

5.2.3 DNA diagnostika

HPV testace je metoda prováděna především u nejasných cytologických nálezů a má za cíl detekovat vysokorizikové typy HPV.⁹⁶

Téměř všechny dnes dostupné detekční metody přítomnosti papilomavirů, jsou koncipovány na principu zjišťování přítomnosti virových nukleových kyselin. V současnosti je pro detekci HPV k dispozici mnoho metod, které lze rozdělit do dvou kategorií, na metody amplifikující cíl a metody amplifikující signál.⁷

Obecně platí, že tato metoda má význam především u pacientek s nejasnými diagnózami, ale jak se ukázalo, testování HPV nemá opodstatnění u diagnóz LSIL a HSIL, které jsou ve většině případů HR HPV pozitivní.⁹⁵

6. Léčebné metody cervikálních neoplazií a karcinomu

6.1 Léčebné metody cervikálních neoplazií

Léčba cervikálních neoplazií je závislá na rozsahu (obr. 13) a lokalizaci léze, obecně však platí, že cervikální neoplazie jsou dobře léčitelné.⁴² Zásadou je odstranit co nejšetrněji celou lézi adekvátně hluboko, a to především u mladých žen plánujících těhotenství. Metody léčby jsou děleny na destrukční a ablační (excizní).⁶¹

6.1.1 Destrukční metody

Při použití těchto léčebných technik se provádí destrukce postižené tkáně po provedení biopsie. Mezi tyto invazivní metody se řadí Kryoterapie, která využívá chladu, konkrétně tekutého dusíku. Po přiložení sondy nastává nekróza tkáně s následným hojením, které je poměrně zdlouhavé. Kryoterapie není velmi finančně náročná, ale její nevýhodou je nemožnost stanovit hloubku destrukce tkáně. Další metodou je laserová vaporizace pomocí laserového paprsku. Hojení děložního hrdla je zde rychlejší než u předešlé metody, ovšem pořizovací cena laseru je velmi vysoká.⁶¹

Destrukční metody jsou dnes zcela nahrazovány metodami ablačními, z toho důvodu, že není histopatologicky vyšetřena kompletní tkáň.⁶¹

6.1.2 Abláční metody

Abláční metody se provádí pomocí skalpelu a nůžek. U výkonu zvaný konizace dochází k vyjmutí válcovité části z děložního čípku. Ve většině případů je konizace taktéž definitivní léčebnou technikou.⁹⁰ Nejčastěji prováděný výkon v současnosti je excize vysokofrekvenční kličkou (LEEP-loop electro excision procedure).⁶¹

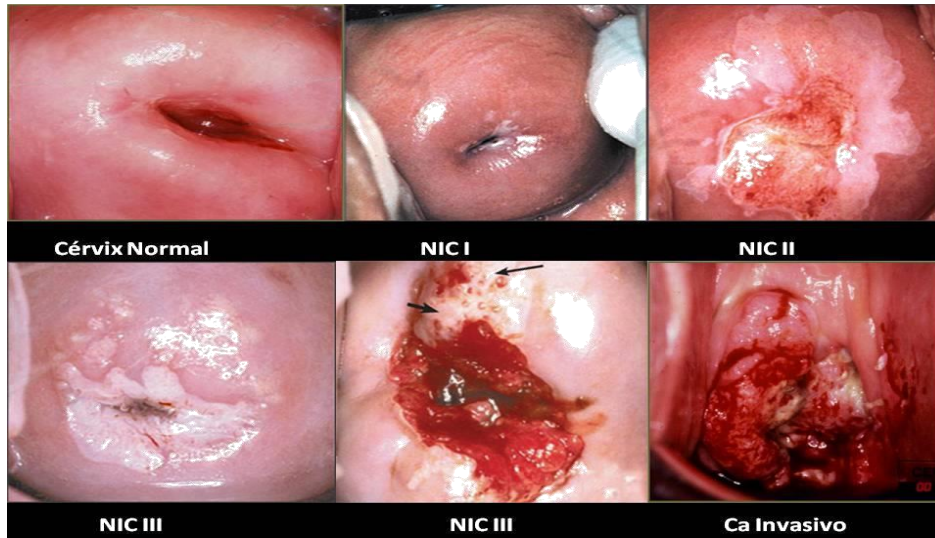
Pro indikaci vhodné léčby se přihlíží ke stupni cervikální neoplazie. Obecně platí že při CIN II a CIN III se doporučuje okamžitě přistoupit k invazivnímu zákroku. V případě CIN I je doporučeno sledování gynekologem a persistence více než jeden rok směřuje k operačnímu zákroku.⁴²

Všechny metody prováděny invazivně, mohou být pro zdraví pacientku rizikové. Tedy veškeré postupy směřující k léčbě CIN jsou spojovány s řadou rizik. Jedná se například o krvácení, infekci či zjizvení tkáně. Excizní metody, zahrnující i často používanou LEEP, taktéž zvyšují riziko předčasného porodu (před 37 týdnem těhotenství).¹⁰⁴

6.2 Léčebné metody karcinomu cervixu

Při stanovení léčby je nutné nejprve zhodnotit rozsah nádoru a rizikové faktory pacientky.⁶¹

Léčba karcinomu děložního čípku zahrnuje 3 primární postupy, které jsou užitý samostatně nebo kombinovaně. Jedná se o operační léčbu, radioterapii a chemoterapii.⁴² U časných stádií je základní metodou léčba chirurgická. Pokud se nádor již šíří do dělohy, je indukována radioterapie. Při pozdních stádiích se využívá rovněž radioterapie v kombinaci s chemoterapií.⁶¹



Obr. 13 Progrese cervikálních neoplazií vedoucí ke vzniku karcinomu cervixu (<http://westerx.lexook.comeze.com>)

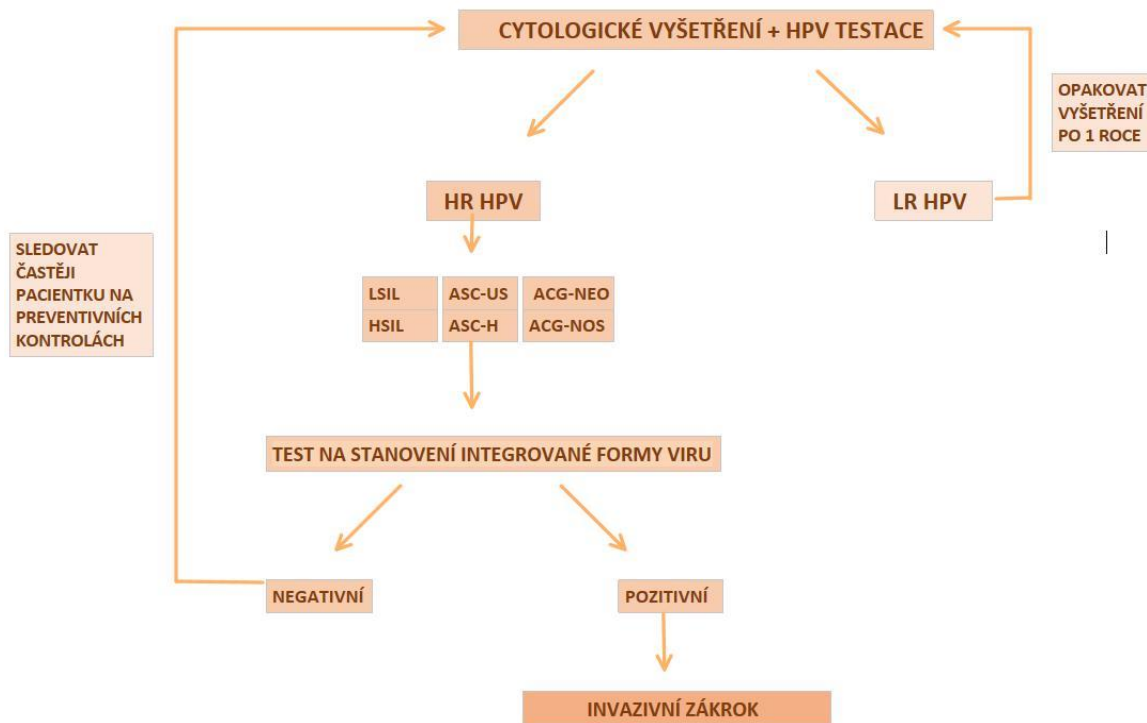
6.3 Metoda integrace vDNA do genomu hostitele

6.3.1 Možné užití metody

Vzhledem k tomu, že stanovení stupně cervikální neoplazie, může být rozhodující při indukování vhodného lékařského zákroku, je potřeba určit riziko progrese cervikálních lézí co nejpřesněji.

Virus se v integrované podobě nachází až v 90 % nádorů děložního čípku⁴¹, přítomnost viru v této podobě by dokázala určit míru rizika pro rozvoj onemocnění. Tato skutečnost se zdá být podstatná především u CIN 2, jelikož tento typ neoplazie se již léčí invazivně⁴², ale až 50 % těchto neoplazií je do dvou let eliminováno vlastním imunitním systémem.⁸⁵

Přítomnost integrace vDNA, by pak mohla pomoci rozhodnout o následné léčbě nejen v případě CIN2, ale taktéž nejasných nálezů jako ASC-US a ASC-H. Možné využití je i při diagnostice buněčných transformací na žláznatém epitelu, jelikož nálezy AGC-NOS a AGC-NEO jsou špatně vyhodnotitelné pomocí standartní onkologické cytologie a kolposkopie.¹⁰⁴



Obr. 14 Schéma postupu léčby za použití metody integrace HPV viru. Nejprve bude odebrán stěr z děložního čípku a následně provedena onkologická cytologie společně s HPV diagnostikou. V případě detekce hrHPV virů je indukována metoda, která stanoví integraci HPV viru do genomu hostitele. V případě pozitivního výsledku se přistupuje k invazivním zákrokům (ablaci, excizi apod.) Pokud bude výsledek negativní, pacientka je dále sledována na pravidelných preventivních kontrolách.

6.3.2 Princip metody na stanovení HPV integrace

Metoda na stanovení integrace vDNA do lidského genomu je molekulárně genetickým vyšetřením přítomnosti virové DNA. Pomocí polymerázové řetězové reakce dochází ke kvantifikaci E2, E6 genu a fluorescenčnímu měření nárůstu amplikonu v reálném čase ve třech fluorescenčních kanálech.

Metoda je tedy koncipována na principu detekce virových proteinů E2 a E6, přičemž vychází z odborných publikací, jako je např. (SatuMaria A. Kulmala 2007, Collins et al. ,2009) a předpokládá se, že v průběhu integrace viru bude nastávat ztráta virového proteinu E2, jelikož ke zlomu cirkulární DNA bude docházet právě v oblasti, která E2 kóduje.

Pro určení integrace byl tedy sledován poměr E2: E6 (1:1), pokud je E6 amplifikován ve větším množství kopií než E2 gen, lze uvažovat štěpení DNA viru právě v místě E2 čtecího rámce a stanovit tak integraci do hostitelské DNA.

Plánované rozdělení jednotlivých forem viru je následovné a bylo stanoveno na základě vzorců:

Při použití kalibrační křivky:

$R = n(E2)/n(E6)$; n= vypočtený počet kopií z Cp na základě kalibrační křivky

Anebo z rozdílů Cp :

$R = 2^{(-\Delta Cp + korekce)}$; $\Delta Cp = Cp(E2, E1, L1 \text{ anebo } L2) / Cp(E6)$

$R \sim 1 \Rightarrow 100\%$ episomální forma

Episomální forma viru (neintegrováno) $x > 0,8$

- Počet kopií E2 a E6 genu je totožný, nebo přibližně totožný.

Směšená forma viru $0,8 - 0,51$

- Počet kopií E2 genu mírně převyšuje počet kopií E6 genu

Integrovaná forma viru $x \leq 0,5$

- Počet kopií E2 genu je výrazně nižší než E6 genu.
- Hranice je zde stanovena, jelikož více než 50 % HPV je v integrované formě

6.3.3 Rozsah použití metody:

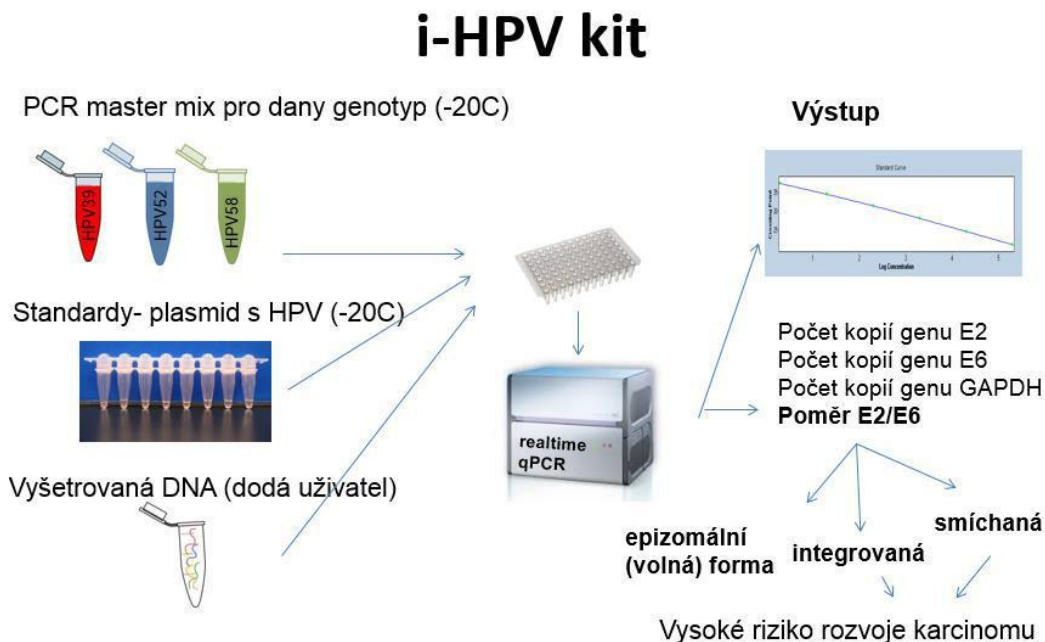
Metodu je možno použít u jakékoliv lidské DNA o dostatečné kvalitě (nedegradovaná, nemodifikovaná chemicky), u které lze očekávat přítomnost DNA viru HPV a jejíž vyšetření má diagnostický, prognostický nebo prediktivní význam pro potenciální rozvoj cervikálního karcinomu.

6.3.4 Koncipování kitu na detekci integrované formy

K provedení detekce integrované formy je potřeba vhodný master mix pro jednotlivé genotypy HPV, následně dostatečně přesné kalibrační řady, které by detekovaly již malé množství DNA papilomaviru a taktéž vyšetřovaný vzorek, který by byl dodán pacientem.

Mastermix společně se standarty a vyšetřovanou DNA by byl nanesen na titrační destičku, ta by pak byla analyzována v přístroji *Cobas 480* nebo *Light Cycler 480* pomocí polymerázové řetězové reakce.

Získaná data by byla zpracována a na základě poměru genu E2 ku E6 by byla stanovena forma genu a s ní spojené riziko rozvoje karcinomu



Obr.15 Schéma postupu při detekci integrace pomocí PCR

6.3.5 Nutné přístrojové vybavení:

Pro přípravu DNA a PCR reakce: izolátor DNA, biohazard laminární box, vortex, centrifuga, spektrofotometr Nanodrop, nastavitelné pipety, plastový spotřební materiál.

Pro amplifikaci: termocykler s měřením fluorescence v reálném čase *LightCycler Instrument 480* anebo *Cobas z 480 Analyzer*, vortex, minicentrifuga, centrifuga pro mikrotitrační destičky a PCR plátky, chladicí stojánky, nastavitelné pipety, pipetovací box, plastový spotřební materiál

6.3.6 Podmínky pro pracovní prostředí

Na pracovní prostředí nejsou kladeny žádné zvláštní podmínky odlišující se od běžných molekulárně biologických laboratorních podmínek (zavedení protikontaminačních opatření včetně fyzického oddělení prePCR a PCR/postPCR areálu).

Izolovaná i amplifikovaná DNA musí být uchovávány v označených zkumavkách při -10 až -20°C.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cíle experimentální části

Ověřit, zdali je nově koncipovaná metoda funkční a dostatečně přesná. Výzkum byl prováděn na genotypech HPV 52, HPV 58 a taktéž HPV 39. Poslední genotyp je však ještě ve stádiu zkoumání, proto zde nejsou uveřejněny všechny jeho výsledky.

Cíle v bodech:

1. Navrhnout primery specifické pro dané geny a ověřit jejich funkčnost
2. Vytvořit dostatečně přesné kalibrační řady pro detekci fragmentace genů
3. Optimalizovat průběh PCR vhodným složením mastermixu
4. Ověřit průběh amplifikace a schopnost metody rozeznat integrovanou formu viru
5. Vyhodnotit data a stanovit episomální, smíšenou a integrovanou formu
6. Ověřit korelaci nálezů se stupněm neoplazie (pokud je stupeň uveden)

1. Laboratorní pomůcky a přístrojové vybavení

V průběhu vykonávání praktické části práce byly použity tyto laboratorní pomůcky:

Pipety (*Eppendorf Research Plus*), Špičky ep T.I.P.S Dualfilter 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (*Eppendorff*), laboratorní plasty a PCR destičky, zkumavky (1,5ml, 2 ml, 14ml), QIA quick PCR Purification kit Qiagen (*Qiagen*), Qubit dsDNA HS Buffer, (*Invitrogen*), Qubit assay tubes, Agilent DNA 1000 Reagents (*AgilentAgilent Technologies*), DNA chips (*Agilent Technologies*), Chip Station Station (*Agilent Technologies*), QI Aamp DNA Micro kit, Qubit dsDNA Reagent 200x (*Qiagen*), (Eva green Dye, 20X in water (*Biotium*,)), Taq DNA polymerase, recombinant 5U/ µl (*ThermoFisher*), Kapa 2G Robust HotStart PCR Kit (*Roche*), Cobas PCR Cell Collection médium (*Roche Diagnostic*), Nextera XT (*Illumina*), PapilloCheck HPV Screening (*Greiner Bio-One*), Cobas PCR Cell Collection médium (*Roche*)

Byla použita následující přístrojová technika:

Vortex Mixer (*Labnet International Inc*), Centrifuga mini Spin (*Eppendorf*), Centrifuga mini Plate Spinner (*Labnet*), Centrifuga CombiSpin (*Biosan*), Flowbox (*Box Biohazard Mars Safety*), Centrifuga ROTINA 420 R (*Hettich Zentrifugen*), LightCycler Instrument 480, Cobas z 480 Analyzer (*Roche*), Centrifuge 5430 (*Eppendorf*), Qubit 2.0 Fluorometer (*Invitrogen*), Agilent 2100 Bioanalyzer, Cobas x 480 (*Roche*), Mastercycler (*Nexus*), MiSeq (*Illumina*), Cobas 4800 HPV Test (*Roche*)

2. Vzorky

K práci byly použity vzorky odebrány při gynekologickém vyšetření pacientkám, zaslané do Ústavu molekulární a translační medicíny (LF UP, Olomouc) diagnostickým účelem. Jednalo se o materiál získaný cervikálním, nebo při samoodběru, cervikovaginálním stěrem

Odebrané vzorky samoodběrem byly skladovány na sucho až do doručení do laboratoře, kde byly fixovány v *Cobas PCR Cell Collection* médiu.

Dohromady bylo zpracováno 41 vzorků genotypu HPV 58, 23 vzorků genotypu HPV 52 . Vzorky genotypu HPV 39 jsou průběžně zpracovávány nyní.

Všechny odběry vzorků pro výzkumné účely, byly schváleny etickou komisí.

2.1 Izolace DNA

Vzorky byly analyzovány na přítomnost HPV 16/18 a dalších 12 vysokorizikových typů HPV pomocí přístroje *Cobas 4800 HPV Test*.

Detekce DNA pomocí *Cobas 4800 HPV Test* je koncipována na základě provedení real-time PCR na přístroji *Cobas z 480*, které přechází izolace DNA na přístroji *Cobas x 480*.

Izolace některých vzorků byla provedena ručně za pomoci *QIAamp DNA Micro kit*, DNA získána tímto způsobem byla více koncentrovaná.

2.2 HPV testace

Genotypizace HPV byla uskutečněna pomocí kitu *PapilloCheck HPV Screening*.

Tento systém je založen na amplifikaci cílové sekvence virové DNA pomocí PCR reakcí s fluorescenčním značením a hybridizací na microarray. Následné vyhodnocení microarray probíhá automaticky za pomoci *CheckScannerTM* a *CheckReportTM Software*.

3. Metody a pracovní postupy

3.1 Návrh primerů

K polymerázové řetězové reakci byly vytvořeny primery pomocí programu *Primer Quest Tool*.

Do programu byla uvedena sekvence daného genu, získaná z databáze *PAVE (Papilloma virus Episteme)*.

Následně byly zadány parametry pro každý primer a vytvořeny specifické fluorescenční látky – próby. Primery a próby byli navrhovány tak aby jejich délka byla v rozpětí od 17 do 30 nt, teplota meltingu od 60 do 70°C (ideálně 62°C pro primery a 68°C pro próby), a byly designovány v oblastech příslušejících pro daný gen, tj. 3300-3600 bp pro E2 gen 100-270 bp pro E6 gen. Primery pro *GAPDH* mi byly dodány již navržené (tab.4).

Návrh prób byl proveden u všech tří genotypů HPV a to pouze pro geny E2 a E6.

Specifita všech primerů pouze k danému genomu HPV byla ověřena v programu *BLAST*. Program *PriDimer Check* byl použit za účelem předejít tvorbě dimerů.

3.1.1 Design primerů a prób pro E2, E6

Vzhledem k primárnímu záměru koncipovat novou diagnostickou metodu pouze pro detekci genů E2 a E6, byly primery a próby původně navrženy pouze pro tyto geny. Vzhledem ke snaze dosáhnout co nejlepší efektivity PCR byly navrhovány primery o krátkých sekvencích do 25 nt (tab. 3).

Tabulka 3 Použité sady primerů pro geny E2 a E6 (Length – délka primeru, T_m-teplota meltingu primeru, GC% - GC content – poměr Guaninu a Cytosinu vyjádřen v procentech)

HPV39-E6 gen					
Amplicon Length: 126					
	Start	Stop	Length	T _m	GC%
Forward	utajeno	utajeno	18	62	50
Probe	utajeno	utajeno	24	68	50
Reverse	utajeno	utajeno	22	62	50

HPV39-E2 gen					
Amplicon Length: 97					
	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	21	62	47.6
Probe	utajeno	utajeno	24	67	50
Reverse	utajeno	utajeno	22	62	50

HPV52-E2 gen					
Amplicon Length: 109	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	21	62	47.6
Probe	utajeno	utajeno	26	68	50
Reverse	utajeno	utajeno	22	62	50

HPV52-E6 gen					
Amplicon Length: 79	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	20	62	50
Probe	utajeno	utajeno	24	67	50
Reverse	utajeno	utajeno	22	62	45.5

HPV58-E2 gen					
Amplicon Length: 97	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	20	62	45
Probe	utajeno	utajeno	24	68	54
Reverse	utajeno	utajeno	23	62	43.5

HPV58-E6 gen					
Amplicon Length: 111	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	20	62	50
Probe	utajeno	utajeno	24	68	50
Reverse	utajeno	utajeno	20	62	50

Sekvence jednotlivých primerů jsou cíleně utajeny z důvodu ochrany duševního vlastnictví a jsou dostupné na vyžádání u autora práce se souhlasem školitele.

GAPDH	1069	GAPDH-F	GAGTGAGTGGGAGACAGAATG
	1070	GAPDH-P	CAACTAGGATGGTGTGGCTCCC
	1071	GAPDH-R	GGGACACAAGGTTACCATATAC

Tabulka 4 Jednotlivé primery a próby pro referenční gen GAPDH

3.1.1.1 Ověřování kvality primerů a práb pomocí PCR

K ověření kvality designu a funkčnosti jednotlivých primerů byla použita polymerázová řetězová reakce.

Master mix do PCR byl připraven standartním způsobem (tab.5). Pipetováno bylo 6 vzorků (2 pro každý genotyp), použita pozitivní kontrola ve formě DNA Caski, kontrola negativní a primer mixy pro referenční gen *GAPDH*. Kalibrační řady pro stanovení koncentrace nebyly použity, vzhledem k tomu, že plazmidy pro jejich vytvoření, ještě nebyly zaslány.

Primer mix pro E2 a E6 byl připraven ve složení:

<i>Reverse primer</i>	4 μ l
<i>Forward primer</i>	4 μ l
<i>Probe</i>	2 μ l
<i>dH2O</i>	150 μ l

Výsledná koncentrace primerů v roztoku byla 2,5 μ M a práb 1,25 μ M

Primer mix pro GAPDH byl připraven ve složení (2x méně primerů):

<i>Reverse primer</i>	2 μ l
<i>Forward primer</i>	2 μ l
<i>Probe 2 μl</i>	2 μ l
<i>dH2O</i>	154 μ l vody

Výsledná koncentrace primerů a práb v roztoku byla 1,25 μ M

Tabulka 5 Složení master mixu za použití fluorescenčních prób

Multiplex – E2 E6 GAPDH	Final	1 R[μl]	25 R [ul]
pol. pufr ThermoTaq[μ l]	1x	2,5	62.5
MgCl ₂ 25mM[μ l]	3mM	3	75
Thermo HotStart Taq pol.[μ l]	1U	0,2	5
Primer Mix E2 + E6		2	50
dNTP 10mM [μ l]	200 uM	0,5	12,5
DEPC H ₂ O [μ l]		14,8	370
část. total		23	575
DNA (50ng)		2 μl	
Total		25 μl (23 MM + 2 DNA)	

Master mix byl připraven pro 25 reakcí s 4% rezervou z důvodu možné nepřesnosti pipetování. PCR byla prováděna na přístroji *LightCycler Instrument 480*.

PCR reakce běžela v programu pro próby ve třech fluorescenčních kanálech FAM, HEX a CY5.

3.1.1.2 Čipová elektroforéza

Jakmile byla potvrzena funkčnost oligonukleotidů v PCR, byla směs použita ke zpracování čipovou elektroforézou. Bylo tomu tak učiněno z důvodu ověření, zdali navržená délka primerů E2 a E6 skutečně odpovídá reálnému produktu. Bylo tedy nutné primery separovat a následně analyzovat.

Obecně je elektroforéza metoda využívající k rozdělení analytu migraci elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Vzhledem k rozdílům mobilit molekul zkoumaného roztoku, které jsou závislé jednak na velikosti náboje na molekule a taktéž na celkové hmotnosti molekuly, dochází k separaci.

V případě použití čipové elektroforézy dochází k separaci roztoku v kanálcích vyleptaných do čipu.

K uskutečnění této metody byl použit přístroj *Aglient 2100 Bioanalyzer* (obr.16).

Složení použité soupravy Aglient DNA 1000 kit bylo následovné

Aglient DNA chip

Chip priming station

DNA 1000 reagents – DNA Ladder, DNA Markers, DNA Dye Concentrate, DNA gel Matrix



Obr.16 Přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer

Za účelem separace produktu bylo postupováno následovně. Nejprve byl smíchán fluorescenční gel (*Gel – Dye mix*). Roztok *DNA dye concentrate* (fluorescenční část) byl inkubován při pokojové teplotě po dobu 30 minut společně s gelem *DNA gel matrix*. Následně byly tyto složky smíchány, tak že do gelu bylo přidáno 25 μl fluorescenční barvy. Směs byla vortexována, centrifugována a opětovně inkubována při pokojové teplotě 30 minut.

Následně byl roztok nanášen na čip *Aglient DNA chip*. Bylo pipetováno 9 μl již nachystaného Gel-Dye mixu do kanálku G. Následně byl gel stlačen a rozprostřen po celé struktuře čipu pomocí čipové primovací stanice *Aglient Chip priming station* a bylo naneseno 9 μl gelu do ostatních 2 kanálků označených písmeny G. Do 12 zbylých kanálků pak bylo naneseno 5 μl *DNA Markeru*. 1 μl roztoku *DNA Ladder* byl umístěn do kolonky označené specifickým symbolem žebříku.

Samotné vzorky pak byly nanášeny postupně do 12 neoznačených kanálků. Čip byl poté zvortexován při 2400 rpm a umístěn do přístroje ke stanovení analýzy.

Získaná data byla vyhodnocena kladně, a tak byly primery i nadále nasazovány do PCR reakcí.

3.1.2 Design primerů pro E1, E2, L1, L2, LCR

U genotypu HPV 58 byly navrženy primerové páry pro geny E1, L1, L2, LCR a nový primer pro gen E2 (tab.6). Při designování oligonukleotidů se postupovalo přibližně stejným způsobem jako u primerů pro gen E2 a E6, pouze s rozdílem že nebyly designovány próby (nahrazeny *Evagreen*) a výsledná délka ampliconu byla větší.

Volba navrhnout primery s delším ampliconem byla uskutečněna s cílem pokrýt co největší možné oblasti sledovaných genů a zaznamenat tak s větší pravděpodobností integraci, i na úkor potenciálnímu poklesu efektivity PCR. Z výše uvedeného důvodu taky byl designován ještě jeden nový primer na E2 gen.

Tabulka 6 Použité sady primerů pro geny E1, E2, L1, L2, LCR, E6 (Length – délka primeru, Tm-teplota meltingu primeru, GC% - GC content – poměr Guaninu a Cytosinu vyjádřen v procentech)

HPV58-L1A					
Amplicon Length: 258	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	22	60	45.5
Reverse	utajeno	utajeno	21	60	47.6

HPV58-L1B					
Amplicon Length	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	22	60	40.9
Reverse	utajeno	utajeno	19	60	47.4

HPV58-L2A					
Amplicon Length: 248	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	21	60	47.6
Reverse	utajeno	utajeno	22	60	40.9

HPV58-L2B					
Amplicon Length: 230	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	19	60	47.4
Reverse	utajeno	utajeno	20	60	50

HPV58-E1A					
Amplicon Length: 230					
	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	20	60	50
Reverse	utajeno	utajeno	19	60	47.4

HPV58-E1B					
Amplicon Length: 282					
	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	22	60	45.5
Reverse	utajeno	utajeno	20	60	45

HPV58-E2B					
Amplicon Length: 257					
	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	19	60	52.6
Reverse	utajeno	utajeno	20	60	40

HPV58-LCR					
Amplicon Length: 250					
	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	utajeno	utajeno	22	60	40.9
Reverse	utajeno	utajeno	17	60	52.9

Jednotlivé sekvence byly účelně utajeny z důvodu ochrany duševního vlastnictví a jsou dostupné na vyžádání u autora práce se souhlasem konzultanta.

3.1.2.1 Ověřování kvality primerů pomocí PCR

Funkčnost jednotlivých primerů byla opět ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce.

Nejprve byl připraven primer mix pro jednotlivé typy oligonukleotidů (tab.7), **ve složení:**

Reverse primer 100 μ M 4 μ l

Forward primer 100 μ M 4 μ l

dH₂O 152 μ l

Výsledná koncentrace primerů v primermixu byla 0,25 μ M

V PCR reakci nebyly použity próby, ale nespecifické fluorescenční barvivo *EvaGreen* (20x concentrate).

Master mix byl sestaven standardizovaným způsobem. Následně byla směs rozdělena do jednotlivých zkumavek, do kterých byl pipetován primer mix pro příslušný zkoumaný gen (tab.8).

Multiplex – E2 E6 GAPDH	Final	1 R[μl]	60R [ul]
pol. pufr ThermoTaq[μ l]	1x	2,5	150
MgCl ₂ 25mM[μ l]	3mM	3	180
Eva green 20x	10x	1	60
Thermo HotStart Taq polymeráza [ul]	1U	0,2	12
dNTP 10mM [ul]	200 uM	0,5	30
DEPC H ₂ O [ul]		13,8	828
čast. Total		21	1260
DNA (50ng)		2 μl	
Total	25 ul (23 MM + 2 DNA)		

Tabulka 7 Složení mastermixu za použití EvaGreen

E1A	140 μ l MM	13 μ l PM
E1B	140 μ l MM	13 μ l PM
E2A	140 μ l MM	13 μ l PM
E2B	140 μ l MM	13 μ l PM
L1A	140 μ l MM	13 μ l PM
L1B	140 μ l MM	13 μ l PM
L2A	140 μ l MM	13 μ l PM
L2B	140 μ l MM	13 μ l PM
LCR	140 μ l MM	13 μ l PM

Tabulka 8 následné rozdělení mastermixu a primermixu do jednotlivých zkumavek, finální koncentrace primerů v mastermixu byla 0,2mM

Při experimentu byla koncentrace DNA získána za použití kalibračních řad obsahujících standardy získané naředěním plazmidu obsahující DNA HPV 58, které byly nanášeny po 2 μ l pro dosažení finálního objemu 25 μ l.

3.1.2.2 Čipová elektroforéza

Po provedení PCR byla velikost skutečného produktu vzhledem k očekávané velikosti primeru ověřena pomocí čipové elektroforézy na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer.

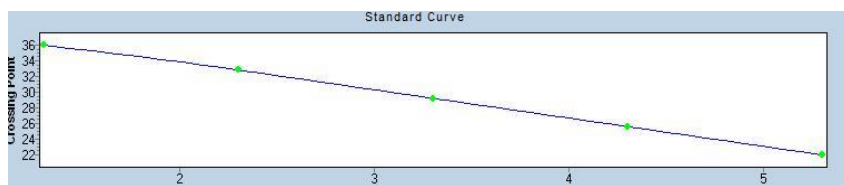
Postupovalo se totožným způsobem jako při analýze primerů E2 a E6.

Primery, u kterých byla data vyhodnocena kladně, byly dále používány v následujících PCR reakcích. V dalších experimentech nebyl používán primer pro LCR (long control region).

3.2 Tvorba kalibračních řad

Kalibrační řady byly vytvořeny za účelem získání kalibrační křivky k metodě PCR. Tato kalibrační křivka pak umožňuje sledovat závislost měřené veličiny (DNA vzorku) na rostoucí koncentraci kalibračních roztoků o předem známe koncentraci. Na základě specifické prahové hodnoty pro každou amplifikační křivku je určen CT bod (Crossing point).

Lineární regresí (dle rovnice $y = a + bx$) CT bodů od DNA o známé koncentraci je vytvořena křivka (Obr. 17), která tedy představuje závislost koncentrace vzorků na intenzitě fluorescenčního záření. Následným dosazením CT bodů do vzorků, jsou získány přibližné výsledné hodnoty jejich koncentrace.



Obr. 17 Příklad standardní kalibrační křivky (E2 gen – HPV52)

Kalibrační řady byly vytvořeny za použití plazmidu, izolovaného z bakteriálních kultur. Plazmidy byly získány ve spolupráci s *International HPV Reference Center (Stockholm)* již modifikované, s nukleovou kyselinou příslušného papilomaviru (tab.9,10).V jednotlivých plazmidech byla obsažena DNA HPV 39, 52 a 58.

HPV type	Vector	Restrikční enzym
HPV39	sp65	EcoRI
HPV52	pUC19	EcoRI
HPV58	pLink 322	BglII

Tabulka 9 Přehled zaslaných vektorů a použitý enzym pro klonování HPV do MCS (multiple cloning sites) – krátkých sekvencí rozpoznávaných restrikčními enzymy

HPV type	Genomesize	vector size	plasmid size	MW
HPV39	7833	3000	10833	7041450
HPV52	7942	2686	10628	6908200
HPV58	7824	5000	12824	8335600

Tabulka 10 Další parametry plazmidu. Celková velikost HPV genotypu (v bp), velikost jednotlivého vektoru a plazmidu. MW poměr vyjadřuje délku DNA (v bp) násobenou vahou jejich bází. U neznámých hodnot MW bylo postupováno podle vzorce $DNA\ délka\ (bp) \times DNA\ hmotnost\ 1bp\ (Da/bp)$, hmotnost 1 bp dsDNA je cca 650 Da

3.2.1 Stanovení koncentrace plazmidu

Hodnota koncentrace plazmidu byla stanovena pomocí přístroje *Quibit 2.0 Fluorometer* (obr.18).

Ke změření koncentrace virové dsDNA (tab.11) byl použit kit s vysokou sensitivitou detekce nukleových kyselin (obr.18). Byl vnášen 1 μ l plazmidu, 1 μ l standartu a celkový objem byl doplněn do 200 μ l HS pufrem. Pipetováno bylo do přiložených zkumavek *Quibit assay tubes*.

Složení roztoku

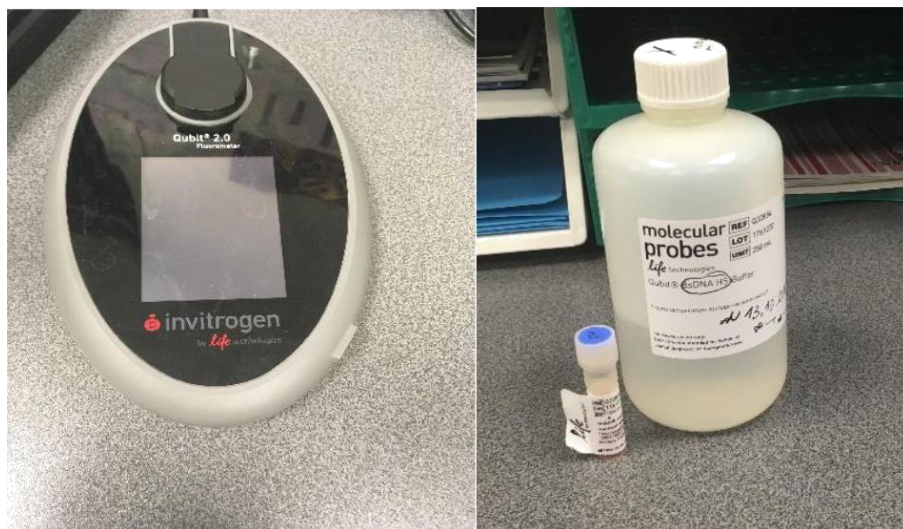
Quibit dsDNA HS Buffer 198 μ l

Quibit dsDNA HS Reagent 200x 1 μ l

DNA 1 μ l

Type	c[ng/ul] 1.measurement	c[ng/ul] 2.measurement	c[ng/ul] average	cM [nmol/l]	DNA co- pies
HPV39	37	37,2	37,1	5,269	3,20E+09
HPV52	66,2	63,4	64,8	9,38	5,60E+09
HPV58	39,6	38	38,8	4,655	2,8E+09

Tabulka 11 Přehled hodnot naměřených koncentrací z prvního, druhého měření a jejich průměr. Koncentrace byla primárně měřena v ng/ μ l, ale výsledek byl taktéž přepočítán na nmol/l. V tabulce je uveden i počet detekovaných DNA kopií



Obr.18 Přístroj Quibit 2.0 a dsDNA HS Buffer a dsDNA HS Reagent 200x

3.2.2 Linearizace plazmidu

Vzhledem k dosažení lepší funkčnosti kalibrační křivky, a tedy ke zvýšení efektivity polymerázové řetězové reakce byla provedena linearizace (rozštěpení plazmidu) restričními endonukleázami v místě mnohočetného klonovacího místa (MCS).

Pro štěpení plazmidů obsahující DNA HPV 52 a HPV 58 byly použity restriční enzymy EcoRI a BglIIBglII.

HPV 52	
EcoRI	1 μ l
10X Buffer O	2 μ l
DNA	1,25 μ l
dH2O	15,75 μ l
Final volume	20 μ l

Tabulka 12 Složení výsledného roztoku při linearizaci plazmidu, HPV 52

HPV 58	
BglII	2μl
10X Buffer O	2μl
DNA	1,25μl
dH ₂ O	14,75μl
Final volume	20μl

Tabulka 13 Složení výsledného roztoku při linearizaci plazmidu, HPV 58

Po připravení reakční směsi (tab.12, 13) byl roztok jemně vortexován a centrifugován na několik sekund. Plazmid byl připraven ve dvou vyhotoveních, první směs se inkubovala 60 minut při teplotě 37 °C v přístroji *Master Cycler*, druhá zkumavka byla inkubována po dobu 12 hodin při totožné teplotě. U obou typů HPV bylo postupováno stejným způsobem.

Vektor genotypu HPV 39 linearizován nebyl.

3.2.3 Purifikace plazmidu

Po skončení inkubace byla DNA HPV purifikována za pomoci *QIA quick PCR Purification kit* (obr.19).

Bylo odebráno 20 μl inkubovaného plazmidu a přeneseno do 1,5 ml zkumavky, následně bylo přidáno 100 μl PB pufru (binding buffer), který umožnil navázání dsDNA na membránu zkumavky *QIAquick column*. Před nanesením směsi na membránu byl roztok lehce vortexován.

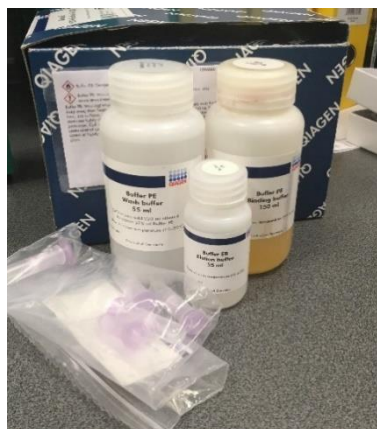
Následně byla směs centrifugována po dobu 60 sekund při 1300 rpm a spodní část zkumavky, obsahující odfiltrovaný pufr, vyměněna za novou.

Pro pročištění membrány bylo přidáno 500 μl PE pufru, znovu centrifugováno (60 s, 1300 rpm) a spodní část zkumavky byla opět vyměněna za novou. K odstranění zbytku pročišťujícího pufru byl plazmid opět centrifugován po dobu jedné minuty. Následně byla *QIAquick column* umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky a na membránu bylo aplikováno 30 μl eluačního pufru pro zvýšení DNA koncentrace (tab.14).

Směs byla inkubována při 1 minutu při pokojové teplotě a následně centrifugována.

DNA	20 μ l
Buffer PB (5:1)	100 μ l
Buffer PE	500 μ l
Buffer EB	30 μ l

Tabulka 14 Složení purifikačního kitu



Obr. Purifikační set QIA quick Purification kit

3.2.4 Měření koncentrace linearizovaného plazmidu

Koncentrace HPV DNA byla provedena standartním způsobem opět za použití přístroje *Quibit 2.0 Fluorometer*. Takto změřená hodnota koncentrace byla využita pro výpočet ředění roztoku pro kalibrační řady u genotypů HPV 52 a 58 (tab.15). Plazmid obsahující vDNA HPV 39 nebyl linearizován, proto pro výpočet ředění kalibračních řad byla použita hodnota koncentrace DNA získána při již při prvotním měření.

Genotyp	c (ng/ μ l)	cM (nmol/l)	počet molekul
HPV 52:	4,2	0,61	3,70E+08
HPV 58:	0,41	0,05	2,94E+07

Tabulka 15 Koncentrace linearizovaných plazmidů HPV 52 a HPV 58

3.2.5 Ředění a tvorba kalibračních řad

Kalibrační řady byly ředěny a sestaveny dle vzorce:

$$M = w / MW; w = M * MW$$

M: DNA molarity, in mol (*koncentrace v molech*)

W: Dna weight, in gram (*váha DNA v gramech*)

MW: DNA molecular weight, in gram/mol (*váha DNA v gramech na mol*)

Pomocí měření na *Quibit 2.0 Fluorometer* a výše uvedeného výpočtu, byla nejdříve získána koncentrace 2.00E7 DNA kopií přidáním vody dH₂O (tab. 16, 17). Tato směs byla následně naředěna na koncentrací 2.00E5 a takto získaný roztok použit jako první bod kalibrační křivky. U linearizovaného plazmidu s HPV 58 byla získána koncentrace 0,41 ng/ul (2,94E7 kopií molekul), z toho důvodu byla vytvořena směs 2.00E7. Dalších 5 bodů bylo vytvořeno desítkovým ředěním prvního bodu destilovanou vodou (tab. 18). Poslední, sedmý bod, byl použit jako negativní kontrola.

V průběhu výzkumné části práce byly vytvořeny kalibrační řady z linearizovaných i neštěpených plazmidů.

2.00E7		
type	DNA (μl)	dH ₂ O (μl)
HPV 39	5	788
HPV 52	5	1407
HPV 58	5	696

Tabulka 16 První ředění roztoku pro dosažení výsledné koncentrace 2.00E7, kalibrační křivka z nelinearizovaného plazmidu

2.00E7		
type	DNA (μl)	H ₂ O (μl)
HPV 52	5	86,6
HPV 58	5	2,4

Tabulka 17 První ředění roztoku pro dosažení výsledné koncentrace 2.00E7, kalibrační křivka z linearizovaného plazmidu

v 1 μ l	Číslo	DNA vyšší řed. řady (μ l) DNA [ul] předch.ředení	H ₂ O ([μ l])
2×10^5	1	5	495
2×10^4	2	10	90
2×10^3	3	10	90
2×10^2	4	10	90
2×10^1	5	10	90
2×10^0	6	10	90
NTC	7	0	90

Tabulka 18 Stovkové ředění pro koncentraci $2.00E5$ a následné desítkové ředění zbývajících kalibračních bodů

Kalibrační řada byla pipetována do 0,25 ml stripů a po dokončení byla vortexována několik sekund a krátce stočena na centrifuze. Mezi jednotlivými experimenty byly řady skladovány při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

V průběhu experimentu byla použita i kalibrační řada genu *GAPDH*, který v průběhu experimentů sloužila jako referenční gen k ověření DNA amplifikace (obr.20).



Obr. 20 Kalibrační řady HPV 39,52,58 a GAPDH

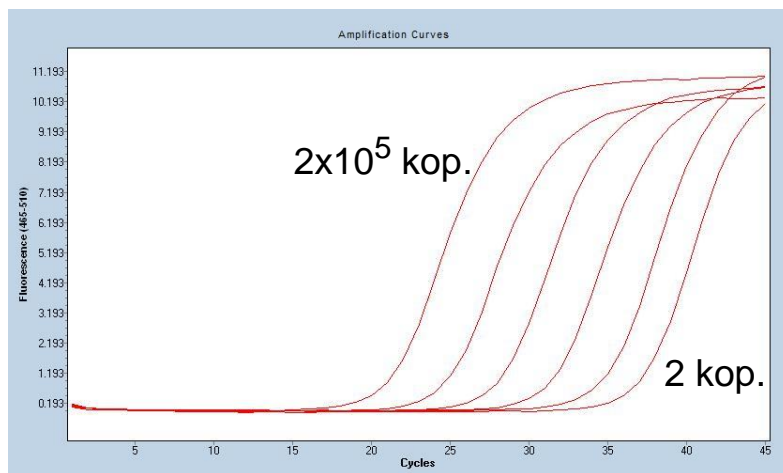
3.2.6 Sekvenování plazmidu

Plazmid obsahující HPV39 a HPV52 byl kompletně sekvenován na přístroji *MiSeq* čtením z obou konců DNA (2×75 bp) za použití kitu *Nextera XT* pro přípravu sekvenační knihovny. Plasmidy byly sekvenovány s průměrným pokrytím $> 1000 \times$.

3.2.7 Ověření kvality kalibračních řad pomocí PCR

Získané kalibrační řady byly použity do PCR reakcí k ověření jejich citlivosti. Mezi parametry, které byly při vyhodnocování použity patřila lineárnost kalibrační křivky, odpovídající hodnoty C_p a množství kopií DNA, které je ještě možno detekovat (obr.21).

Vhodné kalibrační řady pak byly použity do dalších reakcí, a to především standardy obsahující linearizované plazmidy, které se ukázaly být jako nejefektivnější.



Obr.21 Plánovaný vzhled a citlivost kalibrační křivky

3.3 PCR reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction) je metoda molekulární biologie užívána k amplifikaci (množení) specifického úseku DNA *in vitro*.

Princip amplifikace DNA spočívá v syntéze kopií úseku DNA dle templatů (jednořetězcové DNA) pomocí enzymu DNA-polymerázy na principu komplementarity bázi. Pomocí vysoké teploty dochází k denaturaci dsDNA a získaná jednořetězcová DNA slouží jako templát. V další fázi se využívá krátkých oligonukleotidů – primerů, které nasedají na komplementární úseky řetězců DNA, tak že jejich 3' - OH konce směřují naproti sobě, pomocí primerů je vymezen úsek k následné amplifikaci.

K experimentu byla použita Real-time PCR, která umožňuje kvantifikaci dané sekvence DNA v reálném čase. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence, která je umožněna uži-

tím specifických fluorescenčních látek. Byly použity fluorescenční látky k amplifikované sekvenci nespecifické (fluorescenční barvivo *EvaGreen*), či látky specifické (próby).

3.3.1 Optimalizace PCR

Po sestavení kalibračních řad a designu funkčních primerů byl sestaven master mix, který byl dále používán při testování jednotlivých patientských vzorků.

Při testování genotypu HPV 52 byly přidány fluorescenční próby, které byly přímo specifické k určitým sekvencím (tab. 20) U genotypu HPV 58 bylo analyzováno více genů, z toho důvodu bylo použito nespecifické fluorescenční interkalační barvivo *EvaGreen* (tab.19).

Nevýhodou při použití *EvaGreen* se ukázalo být složitější příprava master mixu (nelze smíchat všechny primery do jednoho mixu) a s ní spojené pipetování na titrační destičku.

Množství jednotlivých složek bylo v průběhu experimentů upravováno, popř. byly nahrazovány jinými. Uvedeno je již optimalizované složení mastermixu.

Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek se známým genotypem HPV a známým počtem kopií genu E2, E6 (stejně tak mohla být použita jakákoliv jiná DNA s přinejmenším 1000 kopiemi viru HPV se známým genotypem). Jako negativní kontrola byl užit vzorek bez přítomnosti viru HPV (použita byla dH₂O, ale možnost jakékoliv DNA izolované z krve zdravé osoby).

Postup míchání mastermixu:

- 1) *Byly naředěny primery a próby na požadovanou koncentraci, vytvořen primer mix, próby byly chráněny před světlem pomocí alobalové fólie. Po namíchání krátce zvortexováno a centrifugováno.*
- 2) *Bylo spočítáno množství reakcí, na které se bude test provádět, včetně negativní, pozitivní kontroly a kalibračních řad .*
- 3) *Nevyužitý primer mix a próby byly skladovány při -20 °C.*
- 4) *Dle obr.45 a 46. bylo připraveno složení master mixu s rezervou kvůli nepřesnosti pipetování.*
- 5) *Vzorky, kontroly i kalibrační řady byly nechány rozmraznout, před použitím pulzně vortexovány a stočeny na minicentrifuze.*

- 6) Mastermix s primermixem byl pipetován na destičku, následně byly nanесeny kalibrační řady, kontroly a pacientské vzorky. Souhrný objem roztoku v jednom kanálku činil 25 μ l.
- 7) Destička zalepená fólií s PCR mixem byla centrifugována při 2000 rpm přibližně 30 sekund.

3.3.2 Master mix s použitím fluorescenčního barviva EvaGreen

Multiplex	Final	1 R [μl]	100 R [μl]
5x KAPA2G Buffer A (1,5 mM MgCl ₂)	1x	5	500
MgCl ₂ 25mM [μ l]	2,5mM	1	100
KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase (5 units/ μ l)	0,7U	0,14	14
dNTP 10mM [μ l]	200 uM	0,5	50
EvaGreen	~0,8x	1	100
DEPC H ₂ O [μ l]		10,36	1036
část. total		18	1800
Primermix E2, E1, L1, L2, E6	0,5 uM	5	500
DNA (50 ng)		2	0

Total: 23 μ l MM + 2 μ l DNA

Tabulka 19 Složení mastermixu s Evagreen

Za použití *Evagreen* byly testovány geny E2, E1, L1, L2 a E6. Byly tak vytvořeny primermixy pro E2B, E1AB, L1AB, L2AB a E6.

Primer mix byl přidáván až do hotového master mixu, rozděleného do 8 zkumavek. Jednotlivé části master mixu pak byly opět nanášeny na mikrotitrační destičku a zpracovány v *Light Cycler Instrument 480*. Pro analýzu všech genů bylo nutno použít tři titrační destičky a PCR tak provést 3krát.

Vzorky byly nanášeny v duplikátě – 2 vzorky pro každý gen. V případě nízké koncentrace byla analýza vzorku opakována.

3.3.3 Master mix s použitím fluorescenčních prób

Multiplex	Final	1 R[μl]	100 R [ul]
5x KAPA2G Buffer A (1,5 mM MgCl ₂)	1x	5	500
MgCl ₂ 25mM[μ l]	2,5mM	1	100
KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase (5 units/ μ l)	0,7U	0,1	10
dNTP 10mM [μ l]	200 uM	0,5	50
Primer mix GAPDH	0,2uM	1	100
Primer mix E2, E6	~0,8x	4	400
DEPC H ₂ O [μ l]		11,4	1140
část. total		23	2300
DNA (50ng)		2	0

Total: 23MM + 2 DNA

Tabulka 20 Složení mastermixu s próbami

Do PCR reakcí ke sledování integrace E2 a E6 genů byl přidáván taktéž primermix pro referenční gen *GAPDH*, k ověření amplifikace.

Jednoduše řečeno *GAPDH* slouží k zjištění, jestli byla lidská DNA do vzorku skutečně přidána. Poté co bylo zjištěno, že tento referenční gen je vhodnou součástí metody k ověření amplifikace DNA, nebyl tento gen již v dalších experimentech z důvodu spotřeby testován.

Vzorky byly nanášeny v triplikátě – jeden vzorek byl snímán pomocí 3 kanálů v jedné jamce titrační destičky. V případě nízké koncentrace (pod 10 kopií DNA) byla analýza vzorku zopakována.

3.3.4 Průběh PCR

Metoda integrace HPV viru do genomu byla založena na sledování amplifikace, počtu kopií E2 a E6 genu, popřípadě E1, E2, L1, L2 genů.

Po namíchání mastermixu, bylo této amplifikace dosaženo pomocí polymerázové řetězové reakce na přístroji *Lightcycler 480*.

Bylo postupováno následovně:

- 1) Titrační destička byla vložena do termocycleru a spuštěn ovládací program.
- 2) Byl vybrán formát desky v menu Setting → Instrument (bílá, průhledná deska).
- 3) Následně byl spuštěn příslušný program (viz. obr. XZ, YW).
- 4) Po ukončení amplifikace byla spuštěná analýza výsledku.
- 5) Z možných nastavení bylo vybráno ABS Quant/2nd Derivate Max.
- 6) Při analýze výsledků E2 genů byl vybrán filtr 465–510 nm (FAM), při analýze výsledků E6 genů filtr 540-580 nm (VIC/HEX/Yellow555), při analýze výsledku GAPDH byl použit filtr 610-670 nm (CY5).
- 7) Pokud bylo použito barvivo Evagreen místo prób, nebylo v průběhu analýzy přepínáno mezi jednotlivými filtry, jelikož Evagreen je barvivo zcela nespecifické. Primermixy tak byly rozděleny do samostatně na destičce a nebyly součástí jednotného mastermixu pro všechny reakce.
- 8) Následně byla provedena kvantifikace kopií jednotlivých genů pomocí kalibrační křivky (V části Sample editor – byly označeny standarty a vyplněna jejich koncentrace. Dále následovala Analýza → pomocí programu „calculate“, body kalibrační křivky, které nebyly detekovány, byly vyřazeny.
- 9) Data byla následně vyhodnocena.

3.3.4.1 Amplifikace E2, E6 genu

Postupovalo se standardním způsobem za použití fluorescenčních sond. Reakce běžela s mastermixem připraveným s próbami a primery pro E2, E6 a *GAPDH*. Fluorescence byla zaznamenávána ve 3 kanálech, FAM(E2), HEX (E6) a CY5(GAPDH). Pro PCR reakci byl sestaven teplotní program (tab. 21).

Program name	temperature (°C)	length (min, s)	cycles
Predenaturation	95	4 min	1
Amplification			45
1.	95	15s	
2.	60	60s	
Cooling	37	10s	1

Tabulka 21 Teplotní program s použitím fluorescenčních prób

3.3.4.2 Amplifikace genů E2, E1, L1, L2, E6

Postupovalo se taktéž standartním způsobem za nesespecifického fluorescenčního barviva. Na titrační destičku byl nanášen mastermix připravený s *Evagreen*. Byl nastaven nový program pro barviva *SYBR green a* přidán melting, abychom zjistili, zdali se tvoří specifické/nesespecifické produkty (tab. 22).

Program name	temperature (°C)	length (min, s)	cycles
Pre-incubation	95	15 min	1
Amplification			45
1.	95	15 s	
2.	60	30 s	
3.	72	30 s	
Cool 60	60	30 s	1
Melting Curve	95	continuous	1
Cooling	37	60 s	1

Tabulka 22 Teplotní program s užitím fluorescenčního barviva *Eva green*:

3.4 Zpracování dat

Data byla zpracována a vyhodnocována pomocí programu *Microsoft Office Excel*. Vždy byl zjišťován poměr jednotlivých genů vůči genu E6, jelikož jsme byli přesvědčeni, že k jeho fragmentaci nedochází.

Následný poměr $n(E2, E1, L1, L2) / n(E6)$ byl zpracován metodou „delta Cp“ a dále je označen jako R. Postupováno bylo pomocí vzorce $R = 2^{(-\Delta Cp)}$, kde $\Delta Cp = Cp$ pro (E2,E1,L1 anebo L2) - Cp pro E6.

K rozdílu Cp hodnot jednotlivého genu a genu E6 byla připočítána taktéž hodnota získána korekcí, jakožto průměr jednotlivých delta Cp testovaných vzorků.

Další metoda použita k výpočtu byl podíl koncentrací amplifikované DNA u E1, E2, L1, L2 a u genu E6.

Pokud byly vzorky nanášeny na titrační destičku v triplicátě nebo duplikátě, jejich konečná hodnota pak byla získána vypočítáním aritmetického průměru ze všech hodnot. Vzorky vykazující abnormality, byly z výpočtu vyřazeny.

Na základě získaných dat byla stanovena integrovaná, smíšená nebo episomální forma

Příčemž platí, že:

$x > 0,8$ episomální forma	→	<i>nízké riziko rozvoje karcinomu</i>
$0,8 - 0,51$ smíšená forma	→	<i>mírně zvýšené riziko rozvoje karcinomu</i>
$x \leq 0,5$ integrovaná forma	→	<i>vysoké riziko pro rozvoj karcinomu</i>

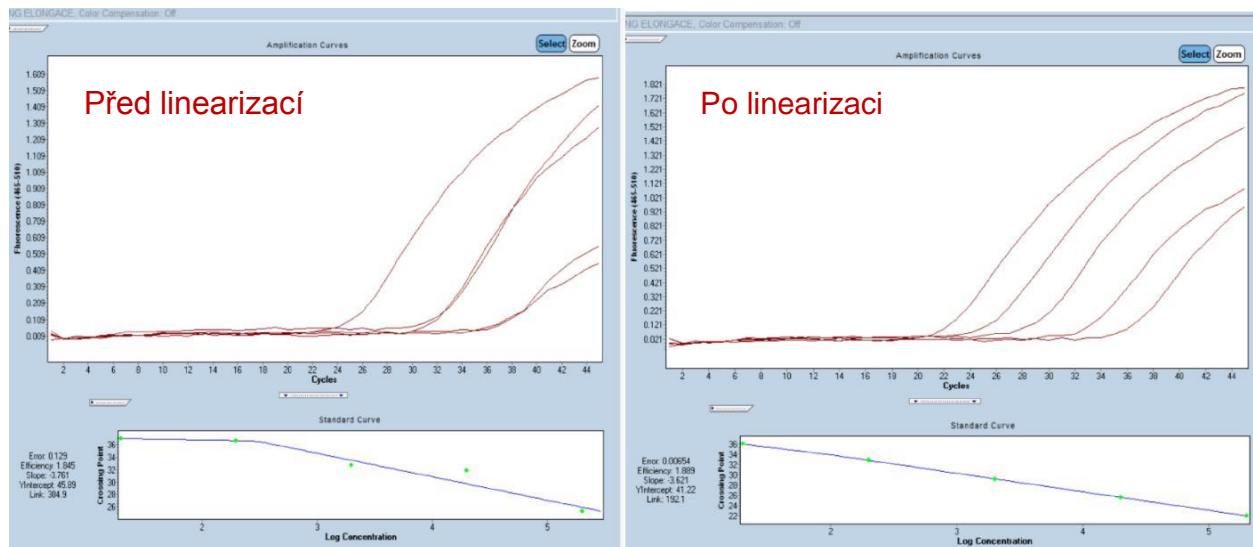
4. Výsledky

4.1 Kalibrační řady potřebné k metodě detekce integrace

Pro sestavení metody bylo potřeba vytvořit kalibrační řady, se známou koncentrací specifické DNA daného HPV, které budou citlivé i pro malé množství DNA kopií. Finální kalibrační řady byly připravovány z linearizovaných a purifikovaných plazmidů, přičemž možnost jejich mutace byla vyloučena pomocí sekvenování.

Nejprve tvorbě kalibračních řad předcházelo pouze měření koncentrace plazmidu na *Agilent* a tak byly nasazovány do PCR reakcí. Tyto kalibrační řady však nebyly pro metodu ideální (viz. obr. 31), nezdály se dostatečně sensitivní, kalibrační křivka nebyla lineární ani velmi periodická, byly zde patrné rozdíly mezi jednotlivými cykly a koeficient efektivity PCR nepřesahoval hodnotu 1,8 (ideální hodnota = 2).

Bylo tak tedy přistoupeno ke štěpení plazmidů pomocí restričních endonukleáz, takto linearizované plazmidy byly již používány v následujících PCR reakcích a k ověření samotné metody detekce integrace. Tyto řady se ukázaly být více senzitivní, přesné, periodické, taktéž hodnota koeficientu efektivity PCR zde byla poznatelně vyšší (obr. 22).



Obr. 22 Kalibrační křivka HPV 52 před a po linearizaci plazmidu. Nejvíce se účinek štěpení plazmidu projevoval právě na genu E2.

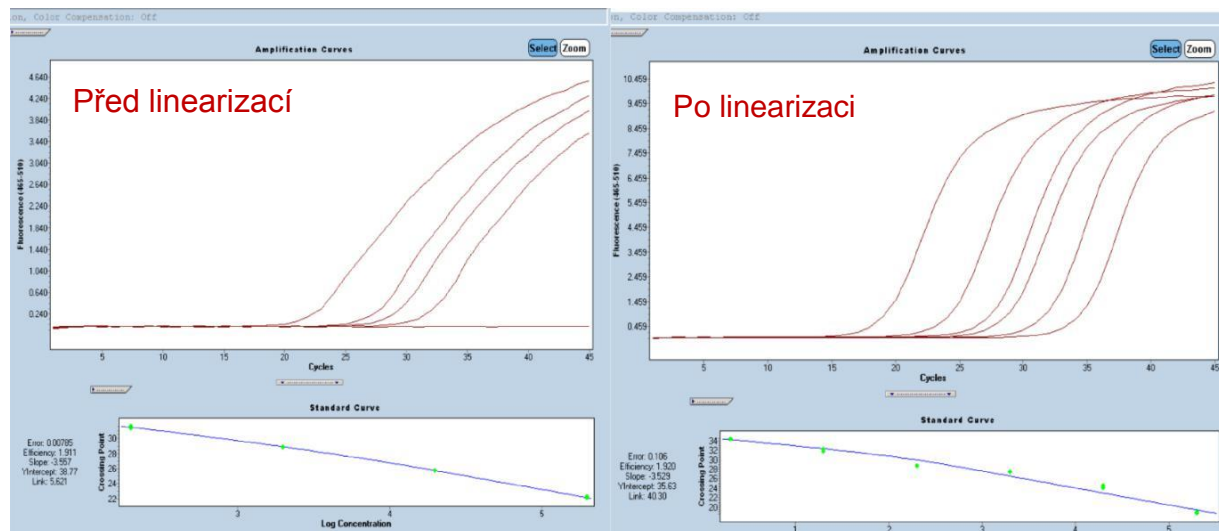
Citlivost metody, při použití kal. křivky (HPV 52 - E2), která byla vytvořena kalibrační řadou s linearizovaným plazmidem, byla pro metodu detekce integrované formy dostatečná. Dokázala detekovat od $1,94 \times 10^5$ kopií DNA až po 20 kopií (tab.23).

Ostatní kalibrační řady taktéž dokázali detekovat přibližně stejný počet kopií, a byly považovány za dostatečně citlivé.

Position	Name	Cp	Concentration
1.	kal52_N	22,07	1,94E+05
2.	kal52_N	25,62	2,03E+04
3.	kal52_N	29,18	2,11E+03
4.	kal52_N	32,95	1,92E+02
5.	kal52_N	36,04	2,00E+01

Tabulka 23 Tabulka Cp hodnot a hodnot koncentrace kalibrační křivky HPV 52 – E2B primer, po linearizaci

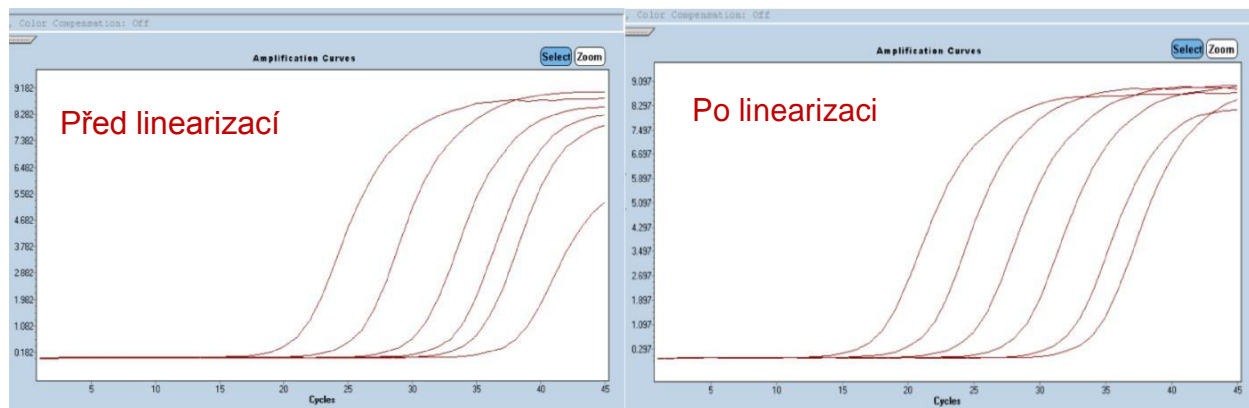
Linearizovány byly také plazmidy, které pak byly použity pro tvorbu kalibrační řady genotypu HPV 58. Opět byly patrné rozdíly v citlivosti detekce DNA kopií, lineárnosti křivky, a tak ve výsledné efektivitě PCR (obr.23).



Obr.23 Kalibrační křivka HPV 58 a gen E2 před a po linearizaci plazmidu.

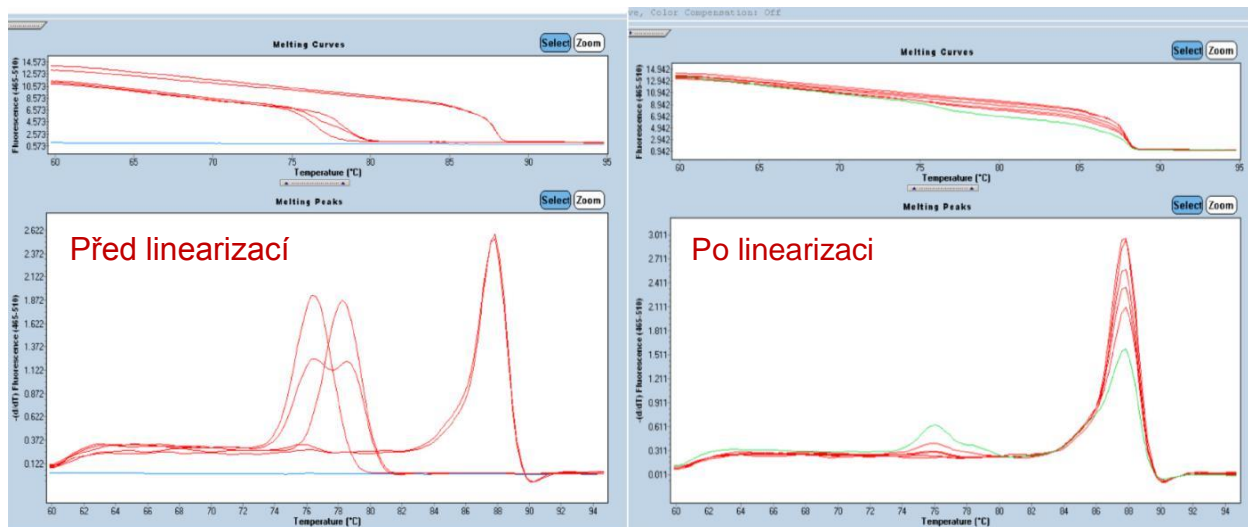
Nepřesnosti kalibračních křivek se projevují zejména tam, kde byly použity nově navržené primery (E2B, E1AB, L1AB a L2AB), jelikož pomocí těchto primerů byl ohraničen a amplifikován mnohem delší amplicon než u původně navržených primerů E2A a E6. Jak již bylo zmíněno, bylo tomu učiněno z důvodu pokrytí větší oblasti genu, což si myslíme, že je pro detekci případné fragmentace podstatné.

U kalibrační křivky E6 genu tedy není pozorován tak markantní rozdíl po štěpení plazmidu a obecně amplifikace u E6 genu probíhala zdaleka nejlépe. (E6 primery byly navrženy pro kratší amplicon). I přes to, je ale u upravených kalibračních řad patrná vyšší citlivost, která se manifestuje sníženými hodnoty C_p , a periodicitou amplifikačních křivek (obr.24).

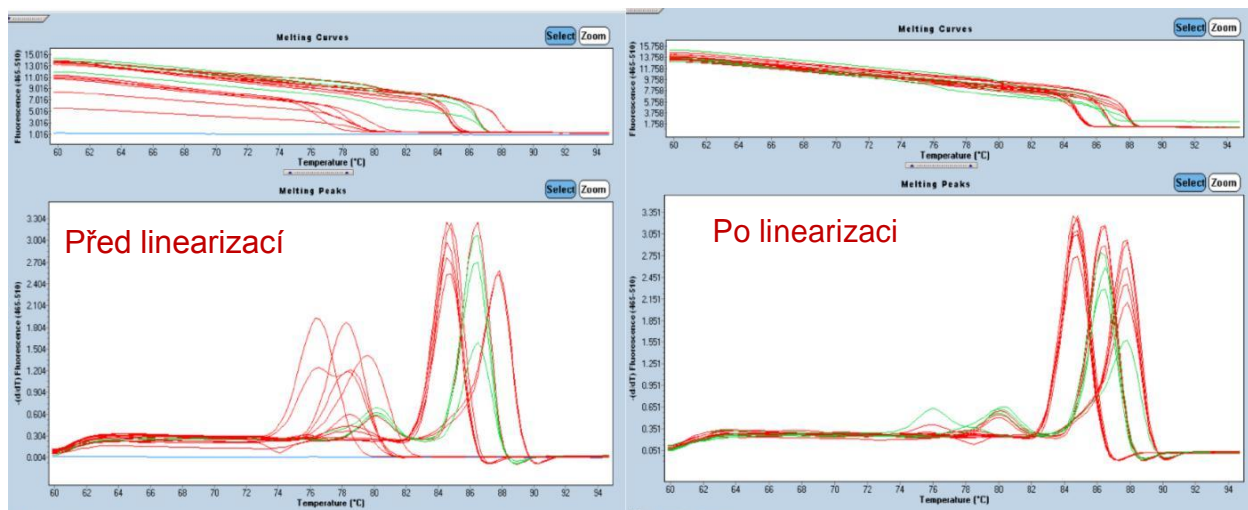


Obr.24 Kalibrační křivka HPV 58 – zkoumaný E gen (primer E6) před a po linearizaci plazmidu

Další patrný rozdíl je pozorován v analýze pomocí analýzy tání DNA duplexu (meltingu). Z meltingových křivek lze pozorovat zvýšenou tvorbu dimerů a nespecifických produktů u kalibrační řady s neštěpenými plazmidy, u standardů s linearizovanými plazmidy naopak tyto nežádoucí abnormality skoro nevznikají (obr. 25, 26).



Obr. 25 Kalibrační křivka HPV 58 melting – zkoumaný L2 gen (primer L2A) před a po linearizaci plazmidu



Obr. 26 Kalibrační křivky HPV 58 melting – zkoumaný E2, L2, E6 gen (primer E2B, L2A, E6) před a po linearizaci

Kalibrační řady pro genotypy HPV 52 a HPV 58, které byly získány linearizací plazmidu, byly tedy považovány za citlivní a zajišťující dostatečně efektivní průběh PCR reakce. Byly použity při následných PCR reakcích při testování metody detekující integrovanou formu u patientských vzorků.

4.2 Ověření navrhnutých primerů pro metodu detekce integrace

HPV

K sestavení metody detekující integraci viru bylo nutno navrhnout pro PCR specifické primery. Jednotlivé parametry, které byly při designu zadávány jsou uvedeny v metodice. Zda-li primery fungují a dochází k amplifikaci DNA, bylo zjištěno smícháním sestavených primermixů s mastermixem, přidáním standartu (popř. vzorku) a provedením PCR.

Při ověřování primerů E2A a E6 ještě nebyly dodány plazmidy, PCR tedy probíhala bez kalibrátorů, místo standardů byly použity vzorky obsahující DNA papilomaviru. Primery E2B, E1AB, L1AB, L2AB a LCR byly nasazeny do PCR reakce již s kalibračními řadami.

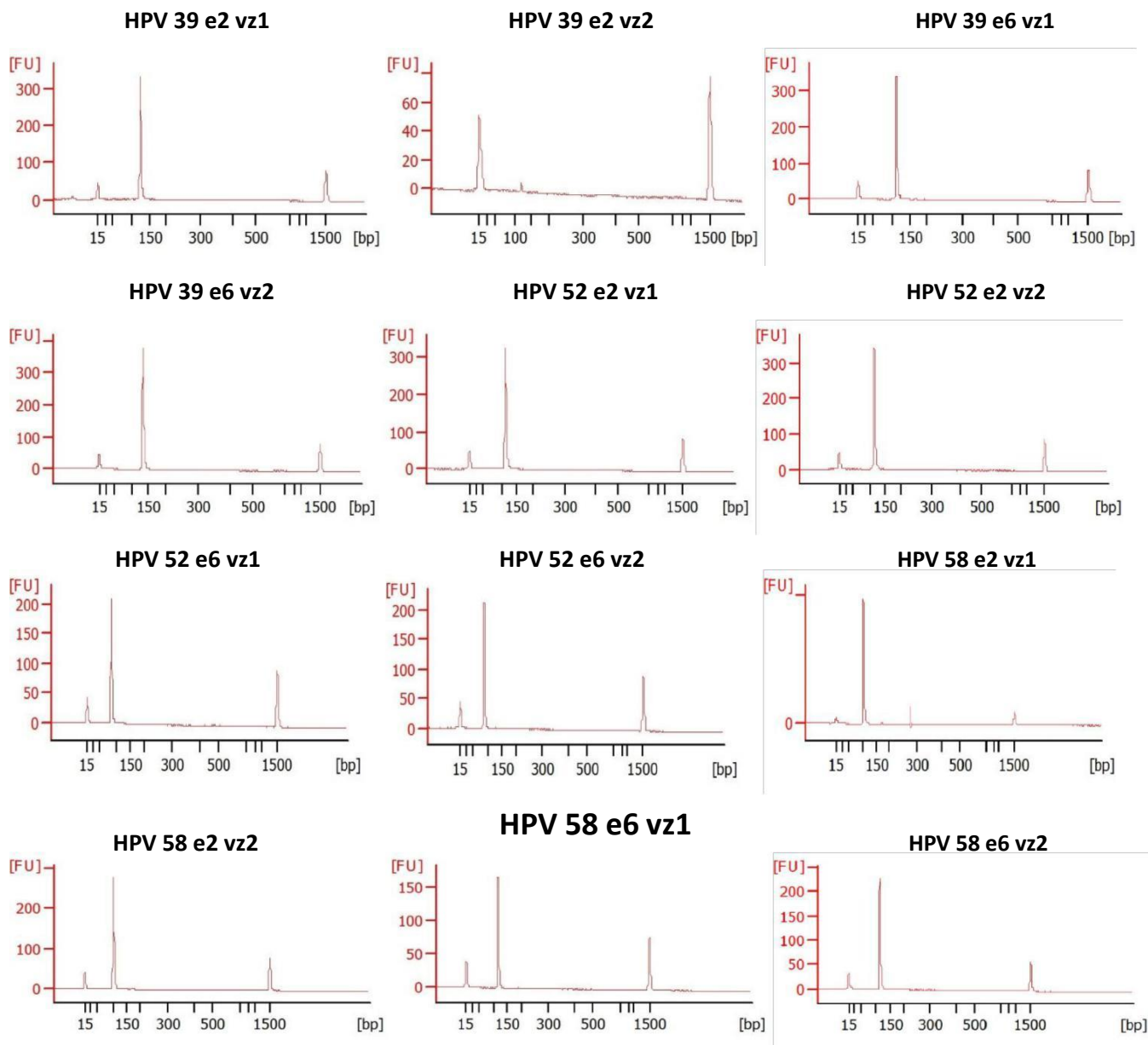
Na problémy jsme narazili při analýze primeru pro LCR, který nedokázal určitou sekvenci vhodně amplifikovat, po následném provedení elektroforézy byl vyřazen.

Všechny primer mixy byly taktéž analyzovány pomocí čipové elektroforézy, aby bylo zjištěno, zda-li navrhovaná délka opravdu odpovídá délce produktu (obr.27, 28).

U elektroforézy provedené pro primery E2A a E6 u genotypů HPV 39,52 a 58 nebyl detekován žádný problém, až na mírné odchylky ve velikosti amplikonu u primeru HPV39 E2 ve dvou vzorcích. Důvodem může být nepřesnost při nanášení nebo technická chyba, jak je možno pozorovat druhý vzorek je zcela v normě.



Obr.27 Virtuální elektroforetický gel (HPV 39,52,58)

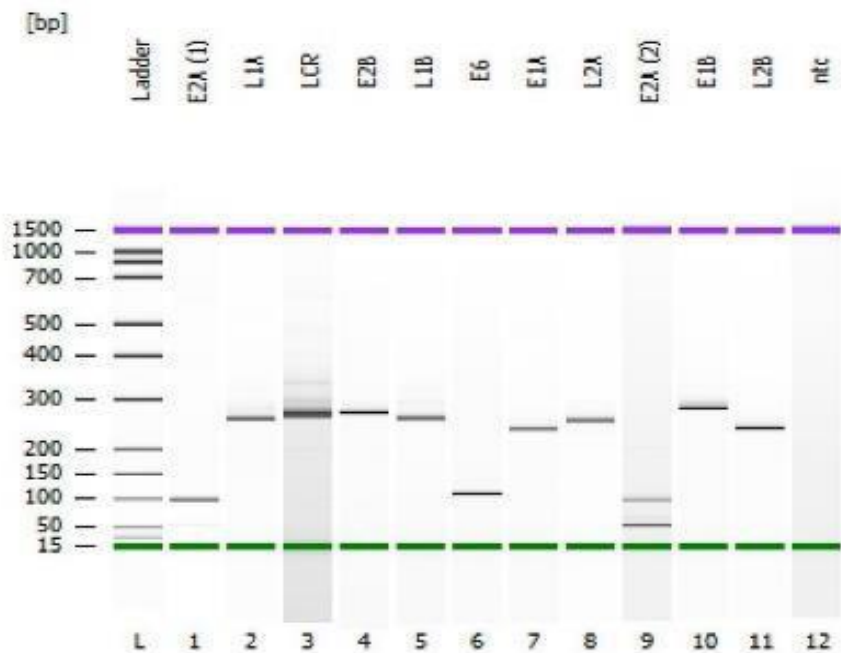


obr.28 Elektroforetogramy PCR produktů pro geny E2 a E6

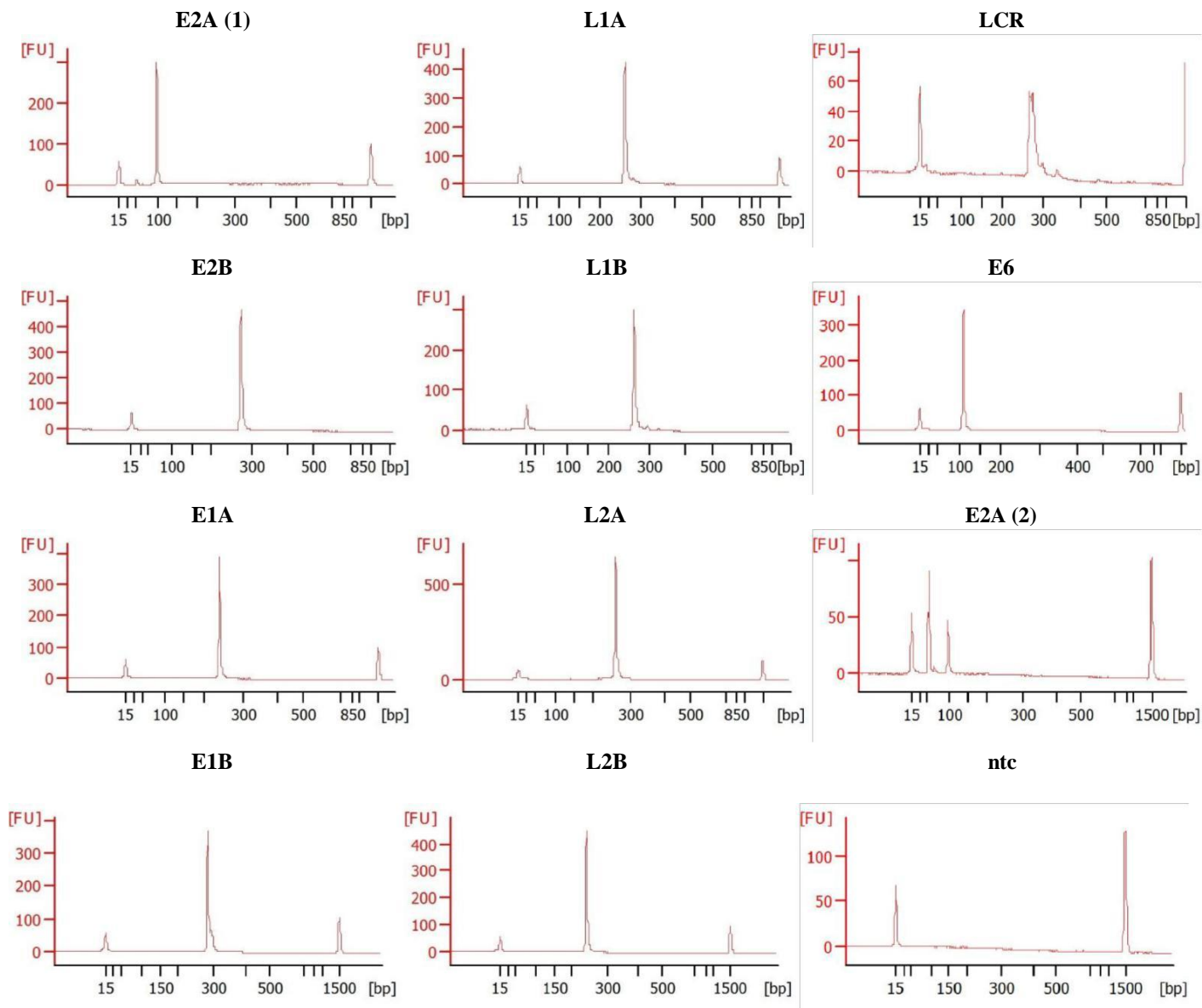
Bylo zjištěno, že navrhovaná velikost opravdu odpovídá skutečné velikosti amplifikačního produktu.

Byla provedena taktéž elektroforéza pro nové primery E2B, E1AB, L1AB, L2AB a LCR (obr. 29, 30).

Opět byla detekována mírná nesrovnalost v tvorbě nespecifických produktů u E2 genu vzorku 9 na elektroforéze, kde byla použita velmi nízká koncentrace DNA. Je známo, že při nízké koncentraci dochází k tvorbě nespecifit (tzv. dimer primer). Druhá kopie pro vysokou koncentraci DNA byla v normálu.



Obr. 29 Virtuální elektroforetický gel (HPV 58)



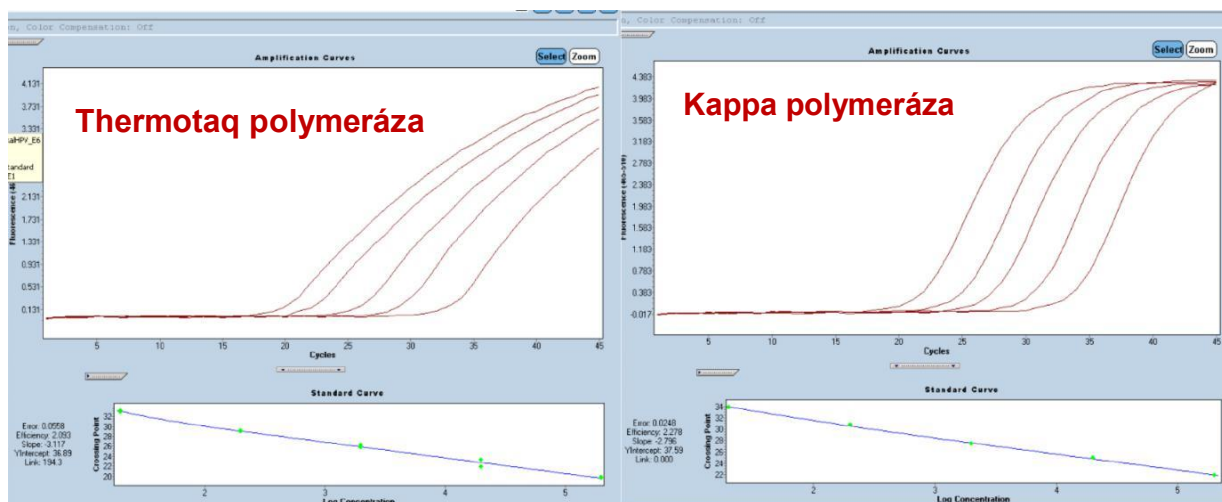
Obr. 30 : Elektroforetogramy PCR produktů pro geny E1, E2, E6, L1, L2

Všechny primery až na primer pro LCR, byly prokázány jako funkční a skutečná velikost produktu odpovídala délce navržené. Primer pro LCR prokazoval tvorbu dimerů a nespecifických produktů, proto byl z další analýzy vyřazen vyřazen a při testování vzorků fragmentace této oblasti nebyla zkoumána. Mírné nesrovnalosti v tvorbě nespecifických produktů u E2A byla vysvětlena opět chybou při nanášení vzorku na čip a nízkou hodnotou koncentrace DNA.

4.3 Optimalizace PCR

PCR byla optimalizována pomocí úprav složení mastermixu.

- 1) Byla vyměněna polymeráza *Taq DNA polymerase* za polymerázu *Kapa 2G Robust*, která byla použita především pro zvýšení efektivity PCR a pro dosažení vhodnějšího tvaru amplifikačních křivek. (obr. 31)



Obr. 31 Kalibrační křivka s použitím dvou druhů DNA-polymeráz

- 2) V souvislosti s výměnou polymerázy bylo sníženo množství $MgCl_2$ a vyměněn stávající pufr za *KAPA2G Buffer A*.
- 3) Následně bylo upraveno množství primermixu GAPDH. Domnívali jsme se, že větší množství GAPDH nepříznivě ovlivňuje amplifikaci v jiných fluorescenčních kanálech. Větší obsah primermixu pro GAPDH ve ke zvýšené spotřebě reagentů nutných pro amplifikaci genů E2 a E6.

4.4 Testování metody

Spolehlivost metody byla testována na vzorcích, získaných od pacientů, u kterých byl detekován papilomavirus genotypu HPV 39,52 nebo 58.

Byla prováděna standardní optimalizovaná PCR reakce s vytvořenými kalibračními řadami a primermixy.

4.4.1 Genotyp HPV 52

Při testování vzorků genotypu HPV 52 byl namíchán standardní mastermix s fluorescenčními próbami.

Byla použita kalibrační řada s linearizovaným plazmidem pro genotyp HPV 52. Jednotlivé vzorky byly nanášeny v triplikátě.

Testováno bylo dohromady 23 vzorků, jejichž DNA byla amplifikována pomocí real time PCR na přístroji *Cobas x 480* (tab.24)

Z celkového počtu vzorků bylo prokázáno 21 forem episomálních, 2 formy smíšené a žádná integrovaná. U určitých vzorků byl uveden také klinický nález.

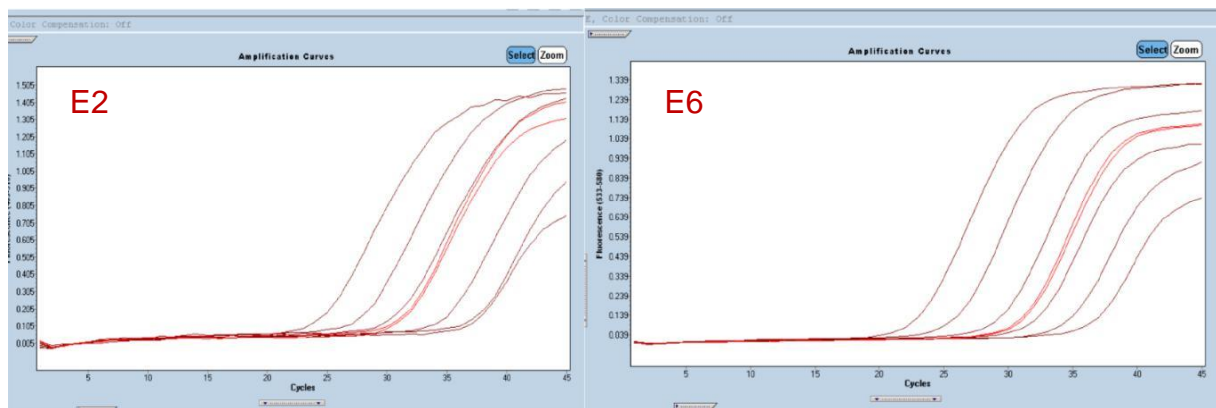
number	sample	E2/E6	klinický nález	
1	1239	1,16	neuveden	episomální forma
2	1321	1,22	neuveden	integrovaná forma
3	1343	0,94	LSIL	Smíšená forma
4	1372	1,08	LSIL	
5	1446	1,05	neuveden	
6	190	0,97	neuveden	
7	2929	1,00	CIN 2	
8	3009	1,00	neuveden	
9	3016	0,91	neuveden	
10	305	0,96	neuveden	
11	306	0,93	neuveden	
12	3092	1,00	neuveden	
13	3116	0,99	neuveden	
14	3334	1,01	neuveden	
15	3519	0,97	CIN 1	
16	3545	0,88	neuveden	
17	3692	0,98	CIN 3	
18	492	1,17	neuveden	
19	571	0,79	CIN 2	
20	572	0,76	CIN3	
21	608	0,90	neuveden	
22	636	1,03	neuveden	
23	973	0,89	neuveden	Průměrná hodnota R(E2/E6): 1,00

Tabulka 24 Analýza dat, stanovení formy HPV 52

Jistou míru korelace klinického nálezu a formy, v jaké se virus nachází, lze spatřit v CIN2 a CIN3 u vzorků 571 a 572, kde byla detekována již smíšená forma viru.

Vzhledem k tomu, že nebyla detekována integrovaná forma ani ve vážnějších nálezech, byla položena otázka, zdali nedochází k integraci i v jiných částech genomu, takto pak byla zodpovězena při testování genotypu HPV 58.

Lze taktéž detekovat menší abnormality v poměru E2/E6 lehce přes 1,00. Tyto hodnoty se však nevyskytují tak často a průměr výsledné reakce je oproti 1,00. Nabízí se zde ale ještě možnost zpřesnění PCR reakce a zvýšení citlivosti metody. Tyto postupy jsou blíže specifikovány v kapitole *Diskuze*.



Obr. 32 Kalibrační křivka HPV 52 (E2, E6) a amplifikační křivka vzorku 608, poslední bod kalibrační křivky byl z analýzy vyřazen; episomální forma

4.4.2 Genotyp HPV 39

Z důvodu, že je tento genotyp ještě zkoumán, nejsou zde tedy uvedeny kompletní výsledky.

4.4.3 Genotyp HPV 58

Vzorky genotypu HPV 58 byly nejprve testovány standardně, kdy bylo předpokládáno že během integrace dochází k fragmentaci pouze E2 genu. Do titrační destičky se pipetoval master mix obsahující próby a vše bylo analyzováno pomocí real-time PCR. Vzorky byly následně vyhodnoceny a stanovena forma HPV viru. Celkem bylo analyzováno 41 vzorků (tab. 25)

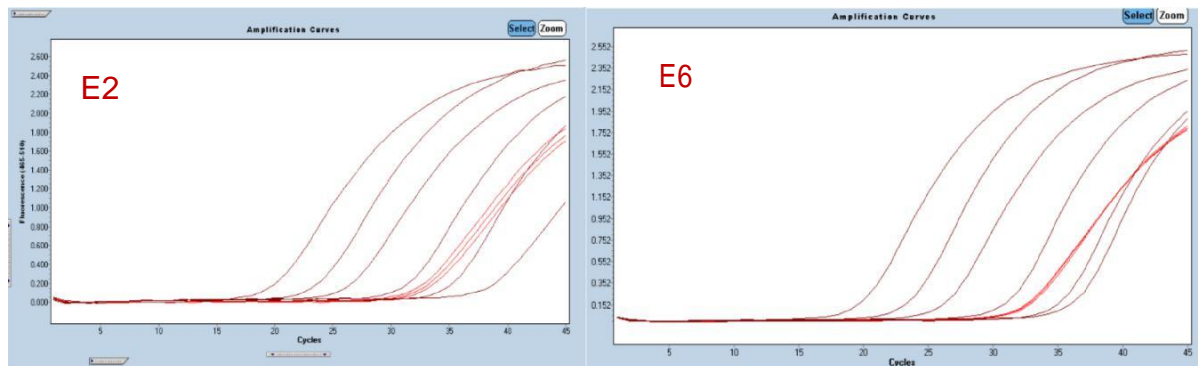
**Průměrná hodnota R(E2/E6):
0,94**

number	sample	E2/E6	klinický nález	episomální forma
1	24	0,89	neueden	smíšená forma
2	50	1,00	neueden	integrována forma
3	64	1,05	ASC-H	
4	124	0,94	neueden	
5	124	0,96	neueden	
6	184	0,96	neueden	
7	203	0,99	neueden	
8	220	0,93	neueden	
9	285	0,94	neueden	
10	302	0,97	neueden	
11	345	0,74	neueden	
12	404	1,00	neueden	
13	409	0,95	neueden	
14	466	0,90	neueden	
15	527	0,89	neueden	
16	590	0,90	neueden	
17	606	0,96	neueden	
18	666	0,96	CIN 3	
19	734	0,99	neueden	
20	1001	0,87	neueden	
21	1032	1,04	neueden	
22	1352	0,94	neueden	
23	1371	1,01	HSIL	
24	1413	0,50	CIN 3	
25	1466	0,77	CIN 3	
26	2066	0,85	neueden	
27	2155	0,90	neueden	
28	2272	1,01	neueden	
29	2596	0,96	ASC-H	
30	2638	0,72	neueden	
31	2697	0,89	LSIL	
32	2703	0,93	neueden	
33	2820	0,85	neueden	
34	2841	0,92	HSIL	
35	2876	0,96	neueden	
36	2894	0,98	CIN 3	
37	2895	0,94	CIN 3	
38	3096	1,01	LSIL	
39	3135	0,84	neueden	
40	3181	0,70	neueden	
41	3280	0,90	ASC-US	

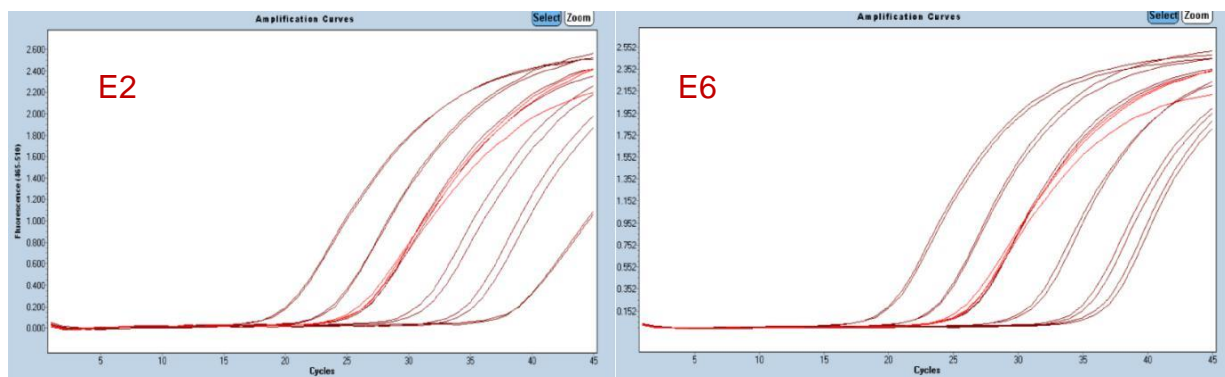
Tabulka 25 Analýza dat, stanovení formy HPV 58

Z celkového počtu vzorků bylo detekována 1 integrovaná (obr. 35) a 4 smíšené formy, ve zbytku se podle našich údajů, nacházel virus v episomální formě (obr. 33, 34).

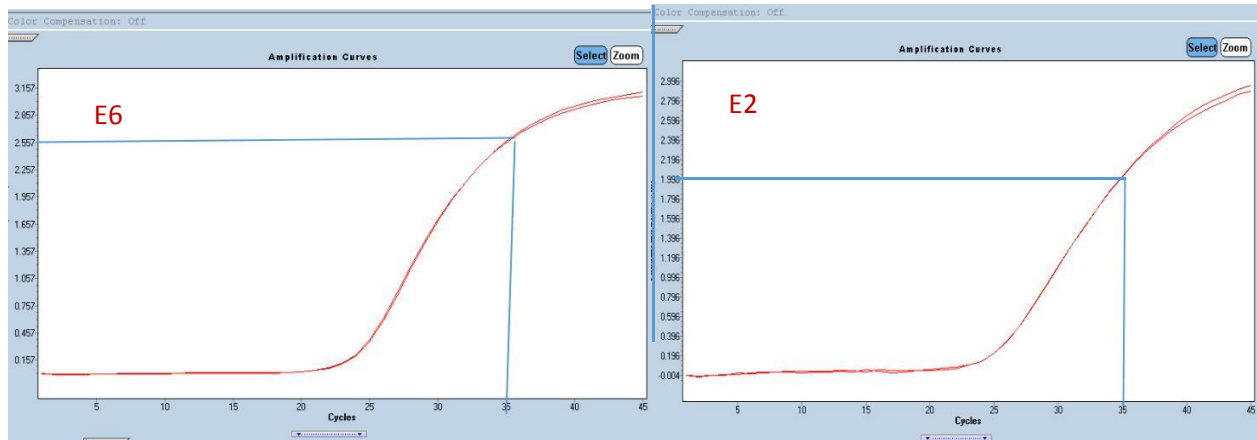
Můžeme opět detekovat občasně odchylky C_p hodnot od 1,00. Nejedná se však o žádné markantní abnormality.



Obr. 33 Amplifikační křivky kalibrátorů HPV 58 (E2, E6) a vzorku 124, poslední body byly z analýzy vyřazeny; episomální forma viru



Obr. 34 Zobrazení kalibrační křivky HPV 58 (E2, E6) v duplikátě a amplifikační křivka vzorku 2820,; episomální forma viru

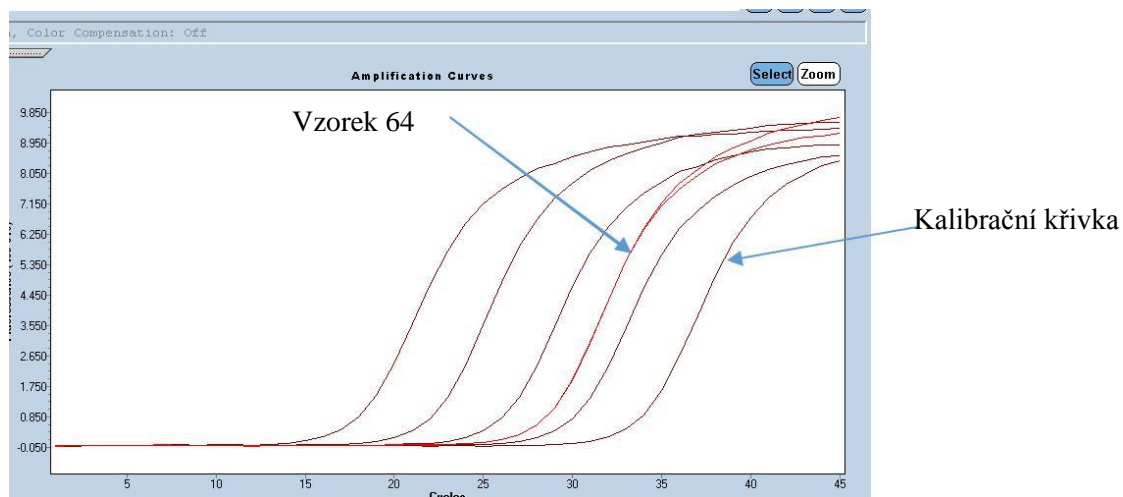


Obr. 35 Vzorek 1413 genotypu HPV 58 – patrné rozdíly v amplifikaci E2 a E6 genu – integrovaná forma

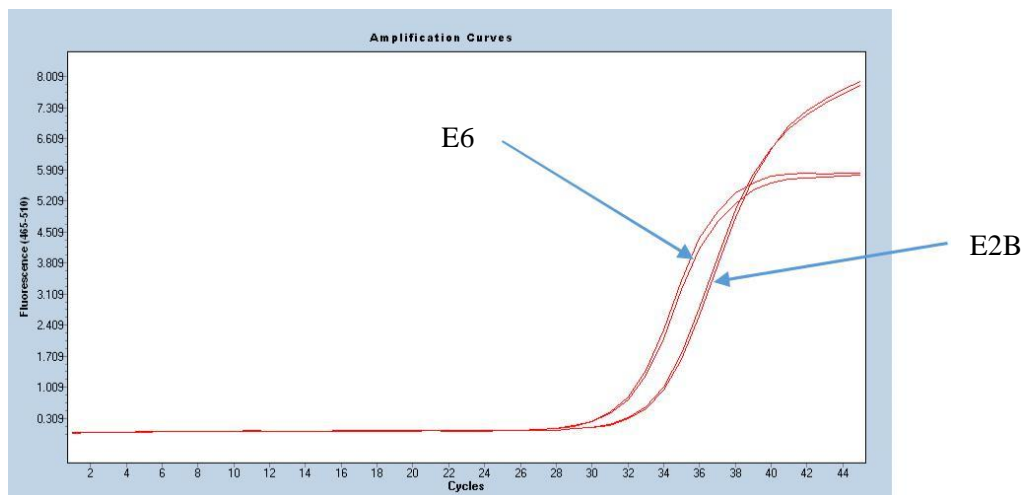
Vzhledem k tomu, že výrazná pozitivní korelace mezi přítomností závažného klinickým nálezu a formou viru nebyla pozorována, bylo rozhodnuto zjistit, zdali nedochází k integraci/štěpení HPV i v jiných místech, než je E2 gen.

Z toho důvodu byly navrženy nové primery pro ostatní geny: E2B, E1AB, L1AB, L2AB. Byl připraven nový mastermix, tentokrát za použití barviva *EvaGreen*.

Po přípravě mastermixu, byla titrační destička opět zpracována pomocí real time PCR. Získaná data byla opět vyhodnocena. (obr. 36, obr.37, tab. 26)



Obr. 36 Amplifikační křivky kalibrátorů HPV 58 (L2 gen) a vzorek 64 (zde v místě L2 genu k fragmentaci nedochází)



Obr. 37 Patrná integrace HPV 58 v místě E2 genu, který byl amplifikován pomocí primeru E2B, vzorek 1466

amplicon localization at HPV genome		~1500	~2200	~3400	~3600	~4500	~5300	~6000	~6700
gene:		E1A	E1B	E2 A	E2B	L2A	L2B	L1A	L1B
sample:	1466	I	I	P 0,77	I	P 0,72	P 0,76	N	N
sample:	2130	N	N	X	P 0,78	P 0,77	P 0,73	P 0,75	N
sample:	2596	N	N	N	N	N	P 0,78	I	P 0,66
sample:	2841	N	N	N	N	N	N	N	N
sample:	2894	N	N	N	N	N	N	N	N
sample:	64	N	P 0,66	N	N	N	N	N	I
sample:	2895	I	I	N	N	I	N	N	N
sample:	666	N	N	N	N	N	N	P 0,60	I
sample:	2703	I	I	N	N	X	X	X	X
sample:	1371	N	N	N	N	N	N	N	P 0,78
sample:	1413	N	N	I	P 0,61	P 0,78	P 0,73	N	I

integrated 0,00 - 0,59
possibly int. 0,60 - 0,79
non int. x > 0,80
values obtained after correction

I	Integrated
P	Possibly integrated
N	non integrated
X	non tested

Tabulka 26 Stanovení formy HPV 58 pomocí sledování fragmentace více genů

Ze získaných a zpracovaných dat usuzujeme že k integraci dochází pravděpodobně i na jiných místech než je pouze sledovaná oblast E2 genu. Přičemž můžeme detekovat i dvoje integrační místa. Jednotlivé zlomy odpovídají možností štěpení genomu, přičemž dochází ke štěpení ve většině případů v genech umístěných vedle sebe. Dochází teda ke ztrátě souvislé části genomu HPV. Taktéž můžeme pozorovat velmi podobné hodnoty mezi jednotlivými geny (hodnoty poměru R jsou uvedeny pouze u pravděpodobně integrovaných míst). Domníváme se tedy, že metoda v případě jejího použití pro analýzu více genů, dokáže detekovat integraci i v jiných místech genomu.

DISKUZE

Záměrem této práce bylo sestavit diagnostickou metodu pro detekci integrované formy HPV viru genotypu 39, 52 a 58. Z u vedených vědeckých studií jako je například (*Stuart I. Collins et al., 2009*) vyplývá, že integrace papilomaviru do lidského genomu má podstatný vliv na vznik karcinomu děložního čípku. ¹¹⁰

Pro přesnou diagnostiku rizika rozvoje nádoru děložního čípku je nutné, aby metoda byla dostatečně přesná, toho lze dosáhnout několika způsoby. Vzhledem k tomu, že je mastermix do mikrotitračních destiček pipetován ručně, mohou vzniknout mírné nepřesnosti. Z tohoto důvodu je potřeba zvýšit robustnost reakce, aby se odchylky při analýze výsledků neprojevovaly. Další možností, jak zvýšit citlivost metody je použití bílých plastů namísto transparentních, konkrétně bílých neprůhledných mikrotitračních destiček. Důvod spočívá v signifikantně lepší schopnosti odrazit fluorescenční signál z PCR reakce do detektoru přístroje. Problém, na který jsem taktéž narazila, bylo zpracování vzorků s nadměrně vysokou koncentrací. Pokud má vzorek příliš vysokou nebo naopak příliš nízkou koncentraci, nemusí být správně detekovaný kalibrační křivkou a může docházet ke zkreslení. Řešením by zde bylo zpřísnění kritéria pro koncentrace jednotlivých vzorků, koncentraci lidské DNA před začátkem metody nejprve změřit a analyzovat pouze vzorky s koncentrací DNA jen v určitém rozpětí, popřípadě tyto vzorky naředit. Další možností je nanášet patientské vzorky ve více opakováních, například jeden vzorek v 5 replikátech. Nabízí se taktéž varianta optimalizace kalibračních křivek pomocí přidání standardního množství lidské DNA místo destilované vody k plazmidu s DNA papilomaviru. Přidáním lidské DNA by se simuloval lépe vzorek DNA pocházející od HPV pozitivní pacientky, který vždy obsahuje směs lidské a virální DNA.

Jak již bylo uvedeno, při testování DNA odebrané pacientům jsem se setkávala převážně s formou episomální, méně již s formou smíšenou a integrovanou. Pokud bych měla výsledky zachytu integrované formy (při testování pouze fragmentace E2 genu) srovnat s výsledky jiných prací, byly přibližně odpovídající. Vědecká studie (*M.Manavi et al., 2008*) integrované formy HPV 58 a 52 viru pomocí metody založené na dvojdimenzionální (2D) gelové elektroforéze, byla

nejčastěji ve všech stupňů cervikálních lézích detekována právě episomální forma, přičemž v CIN 1 a CIN 2 integrovaná forma přítomna nebyla vůbec.¹⁰⁶

Jak již bylo v práci nastíněno, domnívám se, že k sestavení dostatečně přesné metody detekce integrované formy na bázi PCR, je nutné analyzovat více oblastí HPV genomu. Výsledky z mých experimentů, které řeší fragmentaci více genů při integraci mohou opět korelovat například s výsledky vědecké studie (*Li Wang et al., 2013*), která zjišťovala integrační místa u HPV 58 pomocí sekvenační technologie *MyGenostics GenCap Technology*. V uvedené práci byla prokázána u nejčastější lokace integrace právě v místě L1 a E1 genu¹⁰⁷, což by odpovídalo i výsledkům, které jsem získala pomocí polymerázové řetězové reakce při sledování širšího panelu virálních genů

L1, L2, E1 a E2. Tyto výsledky také korelují s prací (*Ying Liu et al., 2015*), kde byla jako místo nejčastější fragmentace vyhodnocena oblast E1 genu pomocí sekvenování za použití technologie *Illumina HiSeq 2000*.¹⁰⁸ Nalezená korelace s jinými pracemi tedy může poukazovat na správnost detekce integračních míst za použití iHPV kitu pro více genů. Domnívám se, že pro větší přesnost metody je tedy potřebné se při diagnostice integrované formy zaměřit na více integračních míst, než je pouze E2 gen.

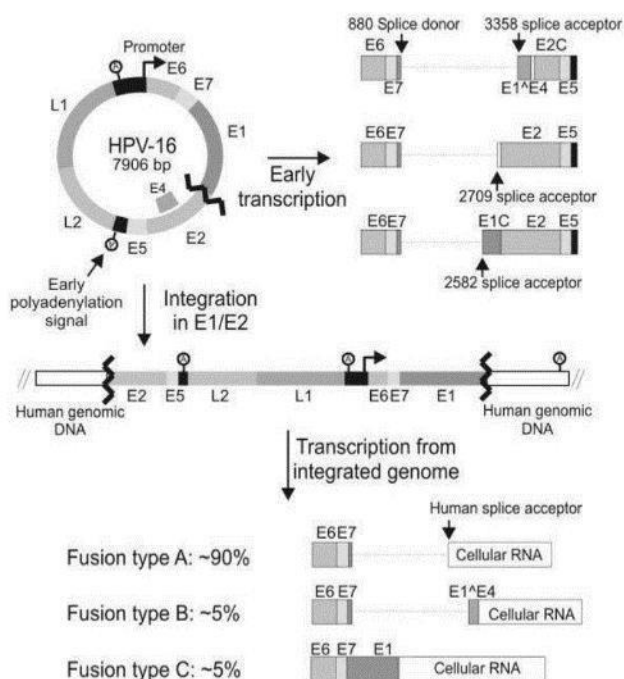
Pokud vezmeme v potaz jiné vědecké publikace jako je například (*Satu-Maria A. Kulmala et al., 2007*), které se zaměřují na detekci integrované formy taktéž formou real-time PCR, je zde uvažována pouze fragmentace E2 genu. V článku (*Satu-Maria A. Kulmala et al., 2007*) je uváděn záchyt integrované formy HPV 16 v perzistentních infekcích pouze 4% z celkového počtu 816 vzorků¹⁰⁹, přičemž jak uvádí (*Ying Liu et al., 2015*), dle výsledků získaných pomocí sekvenování nové generace, by v se v HPV 16 měla vyskytovat integrovaná forma ještě více než v genotypu HPV 58.¹⁰⁸ Domnívám se tedy, že pokud by byla metoda aplikována i na jiné geny, byl by celkový záchyt integrace vyšší, což koreluje taktéž s prací (*Li Wang et al., 2013*) která vyhodnotila opět jako nejvíce časté místo integrace viru HPV 16 právě L1 a E1 gen a to zase pomocí sekvenování.¹⁰⁷

Nabízí se taktéž otázka, jak moc je cílené detekovat fragmentace jiných genů, než je E1 a E2.

Jelikož vzhledem k lokaci promotoru (obr. 38) by teoreticky stále docházelo k expresi E2 genu při integracích v místě L1 a L2 genu, čímž by hypoteticky neměl existovat zvýšený potenciál pro vznik nádoru. Otázka, do jaké míry fragmentace těchto genů může indukovat karcinogenezi ještě

není zcela zodpovězena. Každopádně při fragmentaci genu E1, by promotor taktéž nebyl schopen vyvolat transkripci E2 genu, což by mělo mít stejné proliferační důsledky jako při fragmentaci genu E2. Dalším faktem pak zůstává možnost integrace papilomaviru do lidského genomu v místě například tumorsupresorového genu, což by opět mělo mít důsledek v podobě podpory maligních změn.

Do jaké míry by pak byla naše metoda diferenciovaná by ukázal další výzkum onkogenních potenciálů fragmentace v oblasti L1 a L2 genu.



Obr.38 Schéma změny transkripce časných genů po integraci HPV 16 do lidské DNA. Jak je patrné, po integraci v oblasti E1/E2 je již časný virový promotor (p97) neschopen transkripce E2 genu a čili i jeho následné translace do proteinu (Vinther et al., 2005).

ZÁVĚR

Primárním cílem práce byl vývoj metody stanovující integrovanou nebo episomální (popř. smíšenou) formu viru HPV 39,52,58 a tím i riziko rozvoje karcinomu děložního čípku.

Důraz zde byl kladen především na výzkum genotypu HPV 52 a 58. přičemž výsledky HPV 39 v práci nebyly uvedeny, jelikož je tento genotyp nadále zkoumán.

Jak již bylo nastíněno, detekce integrace hrHPV do lidského genomu pomocí iHPV kitu, je metoda v diagnostice velmi perspektivní, ovšem proto, aby mohla být zcela využívanou metodou, je nutné ji ještě více zpřesnit.

Domnívám se, že kalibrační křivky dokáží detekovat dostatečný počet kopií a bylo patrné zlepšení jejich periodicity po provedené linearizaci plazmidu. Primery jsou k jednotlivým sekvencím genu navrženy správně a master mix byl optimalizován. I přes to, aby tato metoda mohla být plně využívanou diagnostickou metodou, je nutné ji ještě více zdokonalit navrženými postupy uvedenými v kapitole *Diskuze*.

I přes to, že integrace HPV viru není vždy nutná pro progresi cervikální intraepiteliální neoplazie a vzniku karcinomu, má její stanovení možnost progresi předpovědět, a tak i riziko vzniku karcinomu. Tato metoda by pak mohla být novým nástrojem pro screeningový program a užitečným prekurzorem vzniku nádoru děložního čípku.

Podstatné užití této metody spatřuji především ve stanovení progresu či regrese cervikálních intraepiteliálních neoplazií, především druhého a třetího stupně. Přičemž u CIN 2 dochází k regresi v 50 % případů do dvou let, tato léze je však většinou léčena již pomocí invazivního zákroku. Taktéž u CIN 3 dochází k progresi a vzniku cervikálního karcinomu pouze u 12 % případů. Metoda by tak mohla jednat eliminovat nadměrné léčení pacientky, ale zároveň taktéž upozornit na vysoké riziko pro nádorové onemocnění. Zvláštní význam by pak metoda mohla mít i ve stanovení rizika pro rozvoj karcinomu v nespecifických cytologických nálezech ASC-US a ASC-H na ektocervixu a rovněž AGC-NEO a AGC-NOS na endocervixu, které jsou ještě hůře přístupné kolposkopii a cytologickému screeningu.

Možné je i potencionální použití této metody k predikci vývoje nádorů nejen děložního čípku, ale i jiných HPV viry indukovaných karcinomů. Lidské papilomaviry jsou detekovány taktéž v 90-93 % nádorů konečníku, 12-63 % nádorů orofaryngu, 36-40 % nádorů penisu a ve 40-64 % vaginálních karcinomů.¹⁰⁵

Důležitý je pak přínos v podobě nového náhledu na koncipování metody v podobě nutnosti sledování fragmentace více genů, nikoli pouze genu E2, jak udávají jiné práce zaměřující se detekci integrované formy takéž pomocí PCR. Vzhledem k tomu, že jsme pomocí této metody byli schopni detekovat více integračních míst, domníváme se, že při analýze většího množství genů by byl zvýšen záchyt integrované formy. Tuto představu podporují i výsledky dalších prací, které udávají vysokou pravděpodobnost štěpení v místě E1 i L1 genu za použití metody sekvenování. ^{107,108} Je však nutno tuto skutečnost ověřit na více vzorcích.

CITACE

Vědecké publikace

8

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

16

Hu Y et al. HPV16 E6-induced and E6AP-dependent inhibition of the transcriptional coactivator hADA3 in human cervical carcinoma cells. *Cancer Invest*. 2009, 27(3), 298-306. DOI: 10.1080/07357900802350798.

17

Walboomers JM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999, 189(1), 12-19. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.

19

Zheng Hu et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nature Ge-netics*. 2015, 47, 158–163. DOI: 10.1038/ng.3178.

21

Rachel Raybould et al. Human Papillomavirus Integration and its Role in Cervical Malignant Progression. *The Open Clinical Cancer Journal*. 2011, 5, 1-7.

23

Bosch FX et al. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*. 2002, 89(2), 183-90

24

Philippe Clertant et al. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature*. 1984, 311, 276 - 279. DOI: 10.1038/311276a0.

26

Patricia G. Wasserman, Mary R. Schwartz a Teresa M. Darragh. Understanding HPV testing's place in primary screening. *Cap today*. 2007.

27

Zhi-Ming Zheng et al. Understanding HPV testing's place in primary screening. *Front Biosci*. 2006, 11, 2286–2302. DOI: 10.2741/1971.

28

Heather L Howie et al. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. 2009, 384(2), 324-334.

29

Werness, B.A., Levine, A.J., Howley, P.M. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*;248: 76–9.

30

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M. 1990. The E6 onco-protein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63:1129 –36.

31

Li, B., Dou, Q. P. 2000. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97, 3850–3855.

32

Thomas, M., Banks, L. 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*. 17(23):2943-54

33

Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B., Galloway, D.A. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*.

34

KyungWon Huh et al. Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Cullin 2 Ubiquitin Ligase Complex, Which Contributes to Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor. 2007, 81(18), 9737–9747. DOI: 10.1128/JVI.00881-07.

35

Margaret E McLaughlin-Drubin a Karl Munger. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research*. 2009, 143(2), 195-208. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.06.008.

36

S N Khleif et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *PNAS*

37

Ruediger Klaes et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neo-plastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer*. 2001, 92(2), 276–284. DOI: 10.1002/ijc.1174.

40

Molly L. Bristol et al. DNA Damage Reduces the Quality, but Not the Quantity of Human Papillomavirus 16 E1 and E2 DNA Replication. *Viruses*. 2016, 8(6), 175. DOI: 10.3390/v8060175.

41

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

43

Krista L. Conger, Jen-Sing Liu, Shu-Ru Kuo, Louise T. Chow and Teresa S.-F. Wang Human Papillomavirus DNA Replication INTERACTIONS BETWEEN THE VIRAL E1 PROTEIN AND TWO SUBUNITS OF HUMAN DNA POLYMERASE α /PRIMASE. *The journal of biological chemistry*

44

Yuezhen Xue, Shen Yon Toh, Pingping He, Timothy Lim, Diana Lim, Chai Ling Pang, Jean-Pierre Abasta. HPV16-E2 induces prophase arrest and activates the cellular DNA damage re-sponse in vitro and in precursor lesions of cervical carcinoma. *Oncotarget*. 2015, 34979–34991. DOI: 0.18632/oncotarget.5512.

49

Romy van Baars et al. Investigating Diagnostic Problems of CIN 1 and 2 Associated with High-Risk HPV by Combining the Novel Molecular Biomarker PanHPV E4 with P16. *Am J Surg Pat-hol*. 2015, 39(11), 1518–1528. DOI: 10.1097.

50

Maufort JP, Shai A, Pilot HC, et al. A role for HPV 16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010, 77, 837-8385

52

Abramson AL, Nouri M, Mullooly V, et al. Latent human papillomavirus infection is comparable in the larynx and trachea. *J Med Virol* 200; 72: 473-477.

53

Bernfield M, Goette M, Park PW, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Ann Rev Biochem* 1999;68: 729-777

54

Horvath CA, Boulet GA, Renoux Vm, et al. Mechanism of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* 2010; 7: 11.

56

Tjoun-Won Park, M.D., Hisaya Fujiwara, M.D., Ph.D., and Thomas C. Wrihf, M.D. *Molecular Biology of Cervical Cancer and its Precursors*. 1995, 1902-1913.

57

Merle E, Rose RC, LeRoux L, et. al. Nuclear transport of HPV 11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin $\alpha 2\beta 1$ heterodimers. *J Cell Biochem*. 1999, 628-637.

58

Joshua W. Wang and Richard B.S. Roden a. L2, the minor capsid protein of papillomavi-rus. *Virology*. 2013, 175–186.

59

Koenraad Van Doorslaer, Samuel Porter, Caleb McKinney, Wesley H. Stepp, and Alison A. McBridea. Novel recombinant papillomavirus genomes expressing selectable genes. *Sci Rep.* 2016. DOI: 10.1038/srep37782.

64

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

65

Zheng Hu, Da Zhu, Wei Wang et al., Genome-wide profiling of HPV integration in cervical can-cer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nature genetics.* 2015, 158-165. DOI: doi:10.1038/ng.3178.

66

Zhao JW1, Fang F, Guo Y, Zhu TL, Yu YY, Kong FF, Han LF, Chen DS,4, Li F. HPV16 integration probably contributes to cervical oncogenesis through interrupting tumor suppressor genes and inducing chromosome instability. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016. DOI: 10.1186/s13046-016-0454-4.

67

Doorbar J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clinical Science* 110, 525-541.

68

Rashmirani Senapati, Nihar Nalini Senapati, Bhagirathi Dwivedi. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infect Agent Cancer.* 2016. DOI: 10.1186/s13027-016-0107-4.

69

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

70

Margaret Stanley. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2005, 16-22.

71

Matthew P Morrow, Kimberly A Kraynyak et al. Augmentation of cellular and humoral immune responses to HPV16 and HPV18 E6 and E7 antigens by VGX-3100. *Mol Ther Oncolytics*. 2016. DOI: 10.1038/mto.2016.25.

73

Merryn Macville, Evelin Schröck et al. Comprehensive and Definitive Molecular Cytogenetic Characterization of HeLa Cells by Spectral Karyotyping. *Cancer Research*. 1999.

74

Eileen M. Burd. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003, 16(1), 1– 17. DOI: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003.

75

DOMINIÁK-FELDEN G., COHET C., ATRUS-TALLAU S., GILET H., TRISTRAM A., FI-ANDER A., Impact of human papillomavirus-related genital diseases on quality of life and psychosocial wellbeing: results of an observational, health-related quality of life study in the UK, *BMC Public Health*. 2013 Nov 12; 13:1065

81

Petra J. Woestenberg et al. No evidence for cross-protection of the HPV-16/18 vaccine against HPV-6/11 positivity in female STI clinic visitors. *J Infect*. 2017, 1-8.

82

Z. Vernerová. Problematika cervikálních lézí z pohledu patologa. *Praktická gynekologie*., 40-42.

89

Walboomers JM1, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, M. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide., 12-19. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F

94

Lukáš Rob. Screening karcinomu děložního hrdla. *Onkologická péče*. 2007, 11(1), 12-14

97

Fukuda S et al. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther.* 2006, , 1087-1098. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0375.

98

Vaculová, J., Horáček, J., Bystroňová, P. Význam imunohistochemického vyšetření u prekan-ceróz děložního čípku, *Kontakt*, 1, s 157-163, 2007.

99

Fukuda S et al. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000, , 311-322. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0375.

100

Moreno-Acosta P et al. Novel predictive biomarkers for cervical cancer prognosis. *Mol Clin Oncol.* 2016, , 92-796. DOI: 10.3892/mco.2016.1055.

102

M. MICHAL at el. Kontroverze v diagnostice a terapii benigních cervikálních lézí a prekan-ceróz. *Praktická gynekologie*, 23-24.

103

Stefanie J. Klug et al. Prevalence of Human Papillomavirus Types in Women Screened by Cyto-logy in Germany. *Journal of Medical Virology.* 2007, , 616-625. DOI: 10.1002/jmv.20863.

104

Marek Pluta a kol. Konsensus pro řešení abnormálních nálezů ve screeningu cervikálních karcinomů. , 1-9.

105

P Chandrani et al. NGS-based approach to determine the presence of HPV and their sites of inte-gration in human cancer genome. *British Journal of Cancer.* 2015, 1-8. DOI: 10.1038/bjc.2015.121.

106

M.Manavi et al. Human papillomavirus DNA integration and messenger RNA transcription in cervical low-and high-risk squamous intraepithelial lesions in Austrian women. 2008, 18(2), 285–294. DOI: 10.1111/j.1525-1438.2007.01017.x.

107

Li Wang et al. Integration Sites and Genotype Distributions of Human Papillomavirus in Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2013, 6(14), 3837-3841. DOI: 10.7314/APJCP.2013.14.6.3837.

108

Ying Liu et al. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. *Oncotarget.* 2015, 7(5), 5852-5864.

109

Satu-Maria A. Kulmala et al. Type-Specific Persistence of High-Risk Human Papillomavirus Infections in the New Independent States of the former Soviet Union Cohort Study. *Cancer Epi-demiol Biomarkers Prev.* 2007, 16(1), 17-22. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0649.

110

Stuart I. Collins et al. The Natural History of Cervical Human Papillomavirus Disruption of the E2 Gene Is a Common and Early Event in Infection: A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Res.* 2009, (69), 3828-3832. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3099.

Knižní zdroje

3.

FREITAG, P. *Onkogynekologie, minimum pro praxi.* I. vyd. Praha: Triton, 2001. ISBN 80-7254-196-X

4.

CIBULA et al. *Onkogynekologie* 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 614 s. ISBN 978-80-247-2665-6

5

DUŠEK, L., DVOŘÁK, V., CHROUST, K., *Epidemiologie karcinomu hrdla děložního v České republice* [online]. [cit. 2017-01-20].

7

LACO, Jan. Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu. Praha: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-874-2.

9

ČIHÁK, Radomír. Anatomie 2. Praha 1, Malostranské náměstí 28: Avicenum, 1988. ISBN 735 21-08/4.

10

HERBECK, Georg, Jiří ONDRUŠ, Vladimír DVOŘÁK a Alexandros MORTAKIS. Atlas kolpo-skopie. 1.vyd. Praha: Maxdorf, 2011. ISBN 978-80-7345-249-0

12

ROZTOČIL, A.; et al. Porodnictví. Brno: IDV PZ, 2001. 333 s. ISBN: 80-7013-339-2

25

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS Vol.90. Lyon, France, 2007. ISBN 978-92-832-1590-5.

42

Aleš Roztočil et al. Moderní gynekologie. Grada, 2011. ISBN 978-80-247-2832-2.

45

Július Rajčáni. Lévarska Viroológia. 1. VEDA, 2006. ISBN 80-224-0911-7.

46

Robert A Weinberg. The biology of cancer. 2. Garland Science, 2014. ISBN 978-0-8153-4220-5.

47

Leslie Collier et al. Human Virology. New York: Oxford, 2011. ISBN 978-0-19-19-957088-1

61

Lukáš Rob a kol. Gynekologie. 2. Galén, 2008. ISBN 9788072625017

62

Fait, T et al. Očkování proti lidským papilomavirům, Praha: Maxdorf s. r. o, 2009. ISBN 978-80-7345-204-9

72

Freitag, Pavel. Papilomavirové infekce v gynekologii, Praha: Triton, 1998. ISBN 80-85875-93-4

80

FAIT, Tomáš. Očkování proti lidským papilomavirům: Kvadrivalentní HPV vakcína Silgard tři roky v klinické praxi. Praha: Maxdorf, 2009, 118 s. Jessenius: preventivní medicína. ISBN 978-80-7345-204-9.

84

Stanley J. Robboy. Robboy's Pathology of the Female Reproductive Tract. Elsevier Health Sciences, 2009. ISBN 0443074771.

87

MOUKOVÁ, L. FERANEC, R. CHOVANEC, J. Prekancerózy v gynekologii – děložní hrdlo. Klinická Onkologie. 2013. 26. Supplementum. s. 49-51. ISSN 1802-5307

88

SLÁMA, J. Aktuální data o vakcinaci proti HPV. Pediatrie pro praxi. 2011. 12(4). s. 258-260. ISSN 1803-5264.

90

ONDRUŠ J., DVOŘÁK VL., DUŠEK L., MÁJEK O., Screening karcinomu děložního hrdla, 1. vydání, Maxdorf, Praha, 2013, str. 7-8, ISBN: 978-80-7345-322-0

96

Turyna, R., Sláma, J., et al. Kolposkopie děložního hrdla, Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-679-3.

101

Eleftherios P Diamandis et al. *Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications*. Washington, DC: AACC Press, 2002. ISBN 1890883719 9781890883713.

Internetové zdroje

2.

Májek, O., Dvořák, V., Dušek, L., Mužík, J., Šnajdrová, L., Gregor, J. Cervix.cz – Cervical Can-cer Screening Programme in the Czech Republic [online]. Masaryk university, Brno, 2017. [cit. 2017-02-01]. Available at WWW: <http://www.cervix.cz>. ISSN

a) Májek, O., Dvořák, V., Dušek, L., Mužík, J., Šnajdrová, L., Gregor, J. Cervix.cz – Cervical Cancer Screening Programme in the Czech Republic [online]. Masaryk university, Brno, 2017. [cit. 2017-02-01]. Available at WWW: <http://www.cervix.cz>. ISSN 1804-087 X. Version 1.6f.

b) Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic: Czech National Cancer Registry (CNCR) [8/02/2017]. Available from WWW: <http://www.uzis.cz/registry-nzis/nor>

14

Www.eurocytology.eu. In: Eurocytology [online]. [cit. 2017-02-02]. Dostupné z: <http://www.eurocytology.eu/en/course/931>

22

National Cancer Institute at the National Institutes of Health [online]. [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-fact-sheet>

55

Langerhans_cell. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-02-11]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Langerhans_cell

76

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [online]. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5920a4.htm>

77

Www.vakciny.net [online]. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: http://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/HPV.html

78

World Health Organization [online]. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>

79

Zdraví EURO [online]. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/dermatovenerologicke-projevy-infekci-vyvolanych-papillomaviry-267215>

83

American sexual health organization [online]. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.ashasexualhealth.org/>

85

Wikipedia. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Cervical_intraepithelial_neoplasia

86

HPV guide [online]. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.hpv-guide.cz/clanek/cervikalni-intraepitelialni-leze-cin-i>

91

Carcinom in situ. In: *Lékařský slovník online* [online]. Maxdorf, 2008-2012 [cit. 2017-02-14]. Dostupné z: [http://lekarske.slovniky.cz/carcinom in situ](http://lekarske.slovniky.cz/carcinom%20in%20situ)

95

HPV.cervix [online]. [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: <http://www.hpv.cervix.cz/index.html>